



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e
Internacional**

**Estudo da Colonização e Infecção por Streptococos do
grupo B em Grávidas e Recém-nascidos do Distrito de
Santarém**

Filipe Sintra das Neves Borges Rodrigues



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



Estudo da Colonização e Infecção por Estreptococos do grupo B em Grávidas e Recém-nascidos do Distrito de Santarém

Filipe Sintra das Neves Borges Rodrigues

*Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional*

Orientação:

**Professora Doutora Filomena Pereira – IHMT-UNL
Professora Doutora Ilda Sanches – FCT-UNL**

AGRADECIMENTOS

Às orientadoras deste trabalho Professora Doutora Filomena Pereira, Directora da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa e Professora Doutora Ilda Sanches, Directora do Departamento de Ciências da Vida Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, por toda a colaboração prestada na construção deste projecto desde a sua orientação à sua concepção, tornando possível a sua realização.

À Dra. Emília Prieto, da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, pela sua inexcedível disponibilidade e ajuda no desenvolvimento deste estudo.

À Mestre Márcia Rato e ao Dr. Renato Pires, doutorandos do Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, por toda a ajuda e colaboração prestada no desenvolvimento das técnicas moleculares.

À Dra. Manuela Véstia, Directora do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Distrital de Santarém, pelo apoio à realização deste estudo autorizando a recolha de amostras no serviço.

À Dra. Paula Pinto, responsável da secção de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Distrital de Santarém, pela ajuda prestada na selecção e recolha de amostras.

ÍNDICE GERAL

| | Página |
|---|--------|
| ABREVIATURAS | VII |
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | X |
| OBJECTIVOS | 1 |
| INTRODUÇÃO | 2 |
| Características do género <i>Streptococcus</i> | 2 |
| <i>Streptococos</i> do Grupo B (SGB) – Isolamento e Identificação | 3 |
| Métodos de identificação | 5 |
| Métodos de tipagem | 9 |
| Clínica e patologias associadas a SGB | 12 |
| Antibioterapia | 15 |
| Mecanismos de resistência | 17 |
| Epidemiologia | 19 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| População | 27 |
| Metodologia de Investigação | 28 |
| Métodos | 28 |

| | |
|--|---------|
| Isolamento e Identificação | 29 |
| Serogrupagem | 31 |
| TSA | 32 |
| Serotipagem | 34 |
| Tipagem Molecular – PFGE | 35 |
| Deteção de Genes de Resistência aos Macrólidos | 41 |
| RESULTADOS | 45 |
| DISCUSSÃO E CONCLUSÕES | 57 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| ANEXOS | XII |
| ANEXO I | XIII |
| ANEXO II | XVII |
| ANEXO III | XIX |
| ANEXO IV | XXII |

ÍNDICE DE TABELAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabela 1: Efeitos de alterações genéticas no padrão de fragmentos de PFGE, adaptado de (Tenover <i>et al</i> , 1995). | 11 |
| Tabela 2: Antibióticos utilizados na determinação de perfis de susceptibilidade para <i>Streptococcus</i> spp. | 32 |
| Tabela 3: Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento (mm) para interpretação de susceptibilidade aos antibióticos por <i>Streptococcus</i> spp. Excepto <i>S. pneumoniae</i> (NCCLS, 2004). | 34 |
| Tabela 4: Condições de reacção de PCR para genes associados a resistência a Macrólidos (Pires <i>et al</i> , 2005). | 43 |
| Tabela 5: Condições utilizadas no termociclador para amplificação por PCR de genes de resistência a Macrólidos. | 43 |
| Tabela 6: “Primers” ou sequências iniciadoras, utilizadas na detecção de genes de resistência a Macrólidos. | 44 |
| Tabela 7: Estirpes Controlo das reacções de PCR. | 44 |

| | |
|---|----|
| Tabela 8: Distribuição das estirpes estudadas quanto à origem. | 45 |
| Tabela 9: Distribuição de serotipos capsulares. | 46 |
| Tabela 10: Perfis de Susceptibilidade aos Antibióticos. | 47 |
| Tabela 11: Resultados em cm dos halos de inibição produzidos para a estirpe controlo. | 48 |
| Tabela 12: Características dos isolados de SGB, de diferentes origens clínicas quanto ao serotipo, perfil de resistência a antibióticos, fenótipos e genótipos de resistência aos macrólidos. | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1: Halos de hemólise formados no teste de CAMP. | 31 |
| Figura 2: Gel de PFGE com quatro estirpes de SGB. | 49 |
| Figura 3: Dendrograma construído com todos os padrões de <i>SmaI</i> / <i>CfrI</i> gerados por PFGE em SGB. | 50 |
| Figura 4: Dendrograma construído com os padrões de <i>SmaI</i> / <i>CfrI</i> gerados por PFGE em SGB, provenientes de diferentes grávidas. | 52 |
| Figura 5: Fotografias representativas de produtos de amplificação, dos genes de resistência a macrólidos, por PCR. | 56 |

ABREVIATURAS

CAMP – Christie-Atkins-Munch-Petersen

CDC – *Centers for Disease Control*

DNA – ácido desoxiribonucleico

erm – *erythromycin ribosome methylation*

HDS – Hospital Distrital de Santarém

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

mef – *macrolide efflux*

MLS_B – macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B

MIC – Concentrações Mínimas Inibitórias

Nº - Número

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PFGE – *pulse field gel electrophoresis*

SGB – *Streptococcus* do grupo B

SGG – *Streptococcus* do grupo G

TSA – Teste de susceptibilidade aos antibióticos

RESUMO

Apesar do desenvolvimento das ciências médicas e laboratoriais, o *Streptococos* do grupo B (SGB) continua a ser uma importante causa de mortalidade e morbilidade no recém-nascido em muitos países, sendo importante conhecer os seus mecanismos de patogénese, a sua prevalência, bem como as características fenotípicas e genotípicas das estirpes circulantes, mantendo um registo actualizado das resistências bacterianas presentes ao longo do tempo.

O presente estudo avaliou a colonização vaginal/anal por SGB em 270 grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação seguidas no Hospital Distrital de Santarém, no período compreendido entre 9 de Novembro de 2007 e 21 de Junho de 2008. A prevalência da colonização foi de 21,1% estando de acordo com o descrito na literatura. A prevalência dos serotipos capsulares na população estudada foi de: Ia (26,3%), III (19,3%), V (17,55%), IV (15,8%), II (10,5) e Ib (8,8%).

Todas as amostras estudadas apresentaram susceptibilidade à ofloxacina, à penicilina e à vancomicina, tendo-se verificado que a maioria das estirpes era resistente à tetraciclina (80%) e susceptível à eritromicina (90%) e à clindamicina (91,7%). Das estirpes estudadas quanto ao genótipo de resistência aos macrólidos, observou-se que todas apresentavam também resistência à tetraciclina (tet). Metade do número de estirpes estudadas foi concomitantemente resistente à eritromicina e à clindamicina. Destas, 50% apresentou um fenótipo de resistência constitutiva e as restantes de resistência induzida, estando de acordo com os respectivos genótipos, *erm* (B) e *erm* (A).

Pela análise molecular das estirpes por *pulse field gel electrophoresis* verificou-se que não há uma correspondência entre a relação genotípica, os serotipos e fenótipos de resistência aos antibióticos. Da mesma forma verificou-se que existe uma grande heterogeneidade ou policlonalidade entre os isolados estudados.

A prevalência elevada de colonização por SGB entre as grávidas estudadas e a relevante presença de resistências aos antibióticos, enfatizam a importância da prevenção através da detecção da bactéria no final da gravidez e na selecção dos antibióticos apropriados, com especial atenção quando existe alergia à penicilina. Também se recomenda a realização de estudos para caracterizar a população de SGB com vista à criação de vacinas que cubram pelo menos os serotipos mais prevalentes.

Palavras-chave: SGB; colonização; resistência aos antibióticos; prevenção, clonalidade

ABSTRACT

Despite the development of medical and laboratory science, group B streptococci (GBS) remains a major cause of mortality and morbidity in the newborn in many countries, being important to know its mechanisms of pathogenesis, prevalence and the phenotypic and genotypic characteristics of circulating strains, maintaining a register of bacterial resistance over the time.

This study evaluated the vaginal/anal colonization of GBS in 270 pregnant women between 35 and 37 weeks of gestation followed at the Hospital Distrital de Santarém, in the period from 9 November 2007 to 21 June 2008. The prevalence of colonization was 21.1% in agreement with that described in the literature. The prevalence of capsular serotypes in the population studied were: Ia (26,3%), III (19,3%), V (17,55%), IV (15,8%), II (10,5) and Ib (8,8%).

All samples showed susceptibility to ofloxacin, penicillin and vancomycin, and it was found that most strains were resistant to tetracycline (80%) and susceptible to erythromycin (90%) and clindamycin (91.7%). All the strains studied for the identification of genotypes of resistance to macrolides, were also resistant to tetracycline (tet). Half of the strains studied were simultaneous resistant to erythromycin and clindamycin (n=4) and of these, half showed a constitutive phenotype of resistance, with the *erm(B)* genotype and the other half of induced resistance, with the *erm(A)* genotype.

The molecular analysis of the strains by pulse field gel electrophoresis showed no relationship between clonality, serotypes and phenotypes of resistance to antibiotics. It was also found that there is great heterogeneity or polyclonality among the isolates.

The high prevalence of colonization by GBS among the pregnant women studied and the number of resistant antibiotic strains, emphasizes the importance of prevention, trough the detection of GBS at the end of pregnancy and in the selection of appropriate antibiotics, specially when in the presence of penicillin allergy. Studies to characterize

the local GBS serotypes are also recommended with the purpose of creating a vaccine that include the most prevalent serotypes.

Keywords: GBS; colonization, antibiotic resistance, prevention, clonality.

Objectivo geral

O objectivo geral desta investigação foi avaliar a prevalência e factores de risco da infecção e colonização por Estreptococos do grupo B (SGB) na grávida e no recém-nascido e caracterizar antigenicamente e molecularmente as estirpes isoladas.

Objectivos específicos

No âmbito do presente trabalho foram propostos os seguintes objectivos específicos:

- Estudar a prevalência da colonização por Estreptococos do grupo B e seus serotipos capsulares em grávidas do Hospital de Santarém.
- Determinar os fenótipos de resistência a um painel alargado de antimicrobianos incluindo penicilina, tetraciclina, macrólidos (eritromicina), lincosaminas (clindamicina), quinolonas (ofloxacina) e glicopeptídeos (vancomicina).
- Relacionar os serotipos e a resistência aos macrólidos.
- Determinar os genótipos de resistência aos macrólidos e relacioná-los com os fenótipos, diferentes serotipos e tipos clonais.

Introdução

Características do género *Streptococcus*

Os estreptococos são bactérias não móveis, de coloração de Gram positiva, catalase negativas, esféricas, ovóides ou lanceoladas, medindo 0,5 a 2 µm de diâmetro e apresentando-se quase sempre em pares ou em cadeia.

São anaeróbios facultativos, produzindo ácido láctico. Algumas estirpes requerem atmosfera de CO₂ para o seu isolamento inicial, podendo perder este requisito nas subculturas (Henry, 1996).

O género *Streptococcus* é grande e complexo. A primeira edição do *Bergey's Manual* listava 38 espécies, agrupadas em quatro grupos: piogénicos, orais, anaeróbicos e outros. Muitas destas espécies foram posteriormente colocadas em dois novos géneros, *Enterococcus* (18 espécies) e *Lactococcus* (8 espécies) (Prescott *et al*, 1999). Na última edição o género *Streptococcus* apresenta 89 espécies (Garrrity *et al*, 2001).

Muitas características são usadas para identificar estes cocos, os quais podem ser classificados de acordo com três esquemas que se sobrepõem e podem gerar confusão. Um esquema distribui as espécies de estreptococos em divisões fisiológicas: piogénicos, viridans, lácticos, e enterococicos. Noutra metodologia são caracterizados serologicamente, de acordo com as características antigénicas da parede celular, sendo classificados nos grupos de Lancefield. No terceiro esquema são categorizados de

acordo com as reacções hemolíticas provocadas na gelose de sangue de carneiro. As estirpes que hemolisam completamente os glóbulos vermelhos em redor das colónias são denominadas β -hemolíticas, aquelas que produzem uma hemólise parcial (provocando o aparecimento de pigmento esverdeado) são α -hemolíticas e as que não produzem qualquer hemólise são γ -hemolíticas (Henry, 1996).

Streptococos do Grupo B (SGB) – Isolamento e Identificação

O SGB é representado pela espécie *Streptococcus agalactiae*, que está inserida no grupo dos estreptococos piogénicos. Trata-se de uma bactéria de coloração Gram positiva, catalase negativa, β -hemolítica (Strahl *et al*, 2001).

Existem várias formas de identificação, sendo a primeira triagem baseada no tipo de hemólise em gelose de sangue. Apesar de existirem estirpes α -hemolíticas e até γ -hemolíticas, a grande maioria das estirpes apresenta β -hemólise, porém com uma zona de hemólise muito discreta (Facklam, 2002). As colónias de SGB apresentam-se em gelose de sangue de carneiro com colónias maiores que as dos estreptococos do grupo A e com menor intensidade de hemólise (Strahl *et al*, 2001).

Este fenótipo β -hemolítico deve-se à produção de uma hemolisina, que além de provocar a lise dos eritrócitos também causa danos noutras células eucariotas, chamada β -hemolisina/citosina, sendo um importante mecanismo de patogénese (Hensler *et al*, 2008).

A β -hemólise discreta, por vezes só visível após se retirar a colónia da placa de gelose de sangue, as características microscópicas após coloração de Gram (diplococos de coloração de Gram positiva e em pequenas cadeias) e o teste de CAMP positivo são os testes que permitem identificar presuntivamente o SGB.

O factor CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen), descrito em 1994 (Christie *et al*, 1944) é conhecido pela sua utilidade na identificação de SGB, através do teste de CAMP, onde se avalia a produção extracelular de um factor de hemólise produzido pelo SGB, que intensifica a hemólise produzida por estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de β -lisina em gelose de sangue de carneiro (Murray *et al*, 2005).

O factor CAMP foi também citado como sendo um factor de virulência da bactéria. Jurgens e colaboradores (1987), trabalhando com modelos murinos, induziram septicemia e morte quando o factor CAMP foi co-administrado com uma dose sub-letal de SGB; por outro lado, identificaram anti-corpos anti-factor CAMP em soros de humanos e animais infectados, indicando que o mesmo é um antigénio produzido durante o curso das infecções.

A confirmação da identificação de SGB é realizada através da detecção de antigénios do grupo B de Lancefield por meio de testes serológicos. O método padrão para identificação de SGB foi descrito por Lancefield e consiste na cultura da bactéria em meio ácido, a fim de solubilizar o antigénio do grupo B, seguido de uma precipitação capilar com soro hiperimune de coelho (Lancefield, 1933). Actualmente, a aglutinação pelo látex é largamente utilizada, em face da disponibilidade dos reagentes e facilidade

na realização dos testes, bem como da especificidade dos resultados quando são testados microrganismos em culturas puras (Murray *et al*, 2005).

Porém, outra espécie β -hemolítica, *Streptococcus porcinus*, pode reagir com o anti-soro do grupo B em testes comerciais de aglutinação. Contudo, o seu halo de hemólise é mais extenso que o de *S. agalactiae* (Facklam, 2002).

Métodos de identificação

Serogrupagem de Lancefield

Como o tipo de hemólise não era suficiente para distinguir os estreptococos entre si, Rebecca Lancefield desenvolveu um método serológico para a distinção dos *Streptococos* β -hemolíticos (Lancefield, 1933).

A classificação dos estreptococos em grupos serológicos baseia-se nas características antigénicas de um polissacarídeo de composição variável chamado hidrocarboneto C, localizado na parede da célula, que pode ser detectado por diferentes técnicas imunológicas, como a precipitação em tubo capilar ou testes comerciais de aglutinação (Shanson *et al*, 2000).

Tomando por base este polissacarídeo, os estreptococos foram divididos em grupos serológicos (grupos de Lancefield) designados por letras maiúsculas (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N e O). Este método de identificação é amplamente aceite para a identificação dos estreptococos β -hemolíticos. Entretanto, salvo raras excepções, não se

mostrou de utilidade prática para a identificação de estreptococos não β -hemolíticos (Shanson *et al*, 2000).

O polissacarídeo específico do grupo B possui a estrutura mais complexa quando comparada aos hidrocarbonetos C das outras espécies de estreptococos, apresentando uma estrutura central composta de duas unidades de ramnose, glucitol, fosfato e cadeias laterais de ramnose, galactose e N-acetilglucosamina ligados na posição 4 da ramnose central (Pritchard *et al*, 1984).

Meios Cromogénicos – Granada

O “*Centers for Disease Control*” (CDC) recomenda a triagem de todas as mulheres grávidas através da pesquisa de SGB nos tractos vaginal e rectal, entre as 35 e 37 semanas de gestação, utilizando um meio enriquecido (Caldo de Todd-Hewitt), seguido de uma subcultura para gelose de sangue ou outro meio apropriado (Schrag *et al*, 2002). Embora amplamente utilizada e considerada o “*Gold-Standard*”, métodos alternativos à incubação em meio de enriquecimento e subcultura para gelose de sangue de carneiro têm surgido, com o objectivo de melhorar a sensibilidade e especificidade, ao mesmo tempo que reduzem o tempo de incubação e a necessidade de complementação com outros meios de cultura (de la Rosa *et al*, 1992; Garcia Gil *et al*, 1999; Rosa-Fraile *et al*, 1999).

Nesse contexto, foi desenvolvido o meio cromogénico de Granada, cujo princípio se baseia na produção de um pigmento laranja carotenóide exclusivo dos SGB β -

hemolíticos isolados de seres humanos (de la Rosa *et al*, 1992). A utilização do meio de Granada como um meio de isolamento primário, pode melhorar a detecção desses organismos com a capacidade de produzir pigmento, tornando desnecessárias novas subculturas (Forbes *et al*, 1998; Garcia Gil *et al*, 1999). Estas funcionalidades do meio de Granada fazem dele um meio muito sensível, preciso e rápido na detecção de SGB (Adler *et al*, 2008).

Segundo alguns autores não existe uma diferença significativa na recuperação de SGB, quando comparado com a inoculação em LIM Broth ou Todd-Hewitt Broth e posterior incubação em gelose de sangue (de la Rosa *et al*, 1992; Garcia Gil *et al*, 1999; Rosa-Fraile *et al*, 1999).

Segundo Gupta e colaboradores (2004), o meio de Granada é menos sensível do que o método de inoculação em meio enriquecido, seguido de uma subcultura para gelose de sangue e assim não deve substituí-la como o único método para o rastreio de mulheres grávidas para SGB. No entanto, também afirmam que o método do meio de Granada reduz o tempo de detecção para 1 dia e ainda reduz o uso de exames complementares em aproximadamente 90% dos casos positivos. Apesar disso e uma vez que o meio de Granada só não detecta 2% dos SGB, o que corresponde aos que não apresentam pigmento carotenoide, as diferenças encontradas nas taxas de detecção nos exsudados rectovaginal, vaginais e cervicais parecem não ser significativas quando se utiliza o meio de Granada em vez do recomendado pelo CDC.

O meio de Granada contém peptonas, amido e soro de cavalo, que fornecem nutrientes necessários para o crescimento de bactérias. O meio contém MOPS, fosfato de sódio

como tampões e metotrexato que aumenta a produção do pigmento laranja de SGB, assim como dextrose e piruvato de sódio que evitam a formação de compostos inibitórios no meio. Os agentes selectivos presentes no meio são o metronidazol (para inibir anaeróbios Gram-negativos), o sulfato de colistina (Gram-negativos), e o violeta cristal (Gram-positivos), sendo o agar utilizado como agente de solidificação.

Galerias Bioquímicas

O API (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) é um sistema padronizado, que permite a identificação dos microrganismos através da revelação das suas propriedades bioquímicas. Apresenta-se sob a forma de galeria com microtubos contendo os substratos desidratados para a realização dos testes bioquímicos. A Galeria 20 Strep é utilizada para a identificação de bactérias pertencentes ao género *Streptococcus*.

Identificação Automática

O Vitek 2 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) é um aparelho semi-automático utilizado na identificação de microrganismos (bactérias e fungos) e na determinação da sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Este sistema é constituído por cartas de identificação e de antibiograma compostas por pocetos contendo substratos bioquímicos (baseados nos testes bioquímicos convencionais) ou antibióticos. As próprias cartas contêm pocetos que funcionam como controlos negativos e positivos.

A leitura das cartas é realizada pelo método colorimétrico, ou seja, o aparelho detecta a alteração de cor nos pocetos e por comparação com a leitura obtida no poceto do controlo negativo, define a reacção como positiva ou negativa. As cartas para testes de susceptibilidade aos antibióticos (TSA) são lidas pelo método turbidimétrico.

Métodos de tipagem

Serotipagem

O SGB é subdividido em serotipos, de acordo com um polissacarídeo capsular específico. Os polissacarídeos capsulares específicos de SGB são unidades repetidas de cinco a sete monossacarídeos (glicose, galactose, glucosamina e ácido N-acetilneuramínico), dos quais nove são bem conhecidos: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII (Lin *et al*, 2006).

A serotipagem de SGB baseia-se no princípio da co-aglutinação. Lotes diferentes de células inactivadas de *Streptococcus* do grupo G (SGG) são revestidas com anticorpos específicos de coelho para os antígenos polissacarídeos de SGB. Quando colónias de SGB são misturadas com suspensões de SGG revestido, estas aglutinam a suspensão com SGG revestido com o anticorpo correspondente (Hakansson *et al*, 1992).

O SGB também pode ser subdividido de acordo com antígenos proteicos (C, R e X). Os antígenos proteicos C, designados como Ag Ic ou Ib/c, são formados por muitos componentes: um componente resistente à tripsina ou alfa; um componente sensível à tripsina ou beta e um componente gama e outro delta. O Ag R apresenta-se com formas

antigenicamente distintas, permitindo descrever os antígenos: R1, R2, R3, R4, Rib e Ra (Moyo *et al*, 2002).

A serotipagem é, desde há décadas, de grande importância nos estudos epidemiológicos de SGB, tendo sido complementada por métodos moleculares de tipagem, tais como *pulse-field gel electrophoresis* e mais recentemente por *multi-locus sequence typing* (MLST, www.mlst.net/). Enquanto que a caracterização fenotípica avalia as características observáveis de um organismo, como o resultado da expressão de determinados genes, as técnicas moleculares baseiam-se nas características genotípicas dos organismos, avaliando a sua constituição genética. São portanto técnicas que vieram alargar os limites da epidemiologia, fornecendo informação sobre a evolução molecular microbiana (Struelens *et al*, 1996). A técnica de *pulse-field gel electrophoresis* é considerada a de maior poder de resolução de entre todas (Tenover *et al*, 1995).

Pulse-field gel electrophoresis (PFGE)

Esta técnica, quando aplicada à análise de estirpes bacterianas, consiste na separação de fragmentos de restrição de elevado peso molecular, após electroforese em sistemas de campo pulsado, uma vez que estes macrofragmentos de ácido desoxiribonucleico (DNA) não são separados por uma electroforese convencional. Este método implica que o DNA sofra o mínimo de fragmentação possível para que a lise ocorra *in situ* e o DNA cromossomal seja digerido com endonucleases de corte raro, pelo que as células são incorporadas em agarose. O padrão de bandas de restrição obtido de cada isolado é

comparado com outro, de modo a inferir qual a relação epidemiológica entre os dois isolados (Tenover *et al*, 1995).

Esta interpretação assenta no princípio de que dois isolados que apresentem o mesmo padrão de restrição (com um mínimo de dez bandas) pertencem à mesma estirpe, enquanto que os isolados que apresentem padrões de restrição diferentes, tanto no número de fragmentos, como na posição desses fragmentos, pertencem a estirpes diferentes, que são consideradas como relacionadas (se possuírem até três fragmentos diferentes) ou possivelmente relacionadas (se possuírem até seis fragmentos diferentes). Para além desta proposta de critérios de interpretação, os autores sugerem qual a relação entre as alterações genéticas que modificam os locais de restrição e as variações observadas nos perfis de restrição gerados por PFGE (ver Tabela 1) (Tenover *et al*, 1995).

Tabela 1: Efeitos de alterações genéticas no padrão de fragmentos de PFGE, adaptado de (Tenover *et al*, 1995).

| Evento genético ocorrido | Alterações no padrão PFGE | Nº de diferenças consideradas |
|---|--|--------------------------------------|
| Mutação pontual que cria um local de restrição. | O padrão PFGE entre duas estirpes será semelhante, mas uma estirpe não tem um fragmento, apresentando dois fragmentos de menor tamanho | Diferença em três fragmentos |
| Mutação pontual que resulta na perda de um local de restrição. | O padrão alterado apresentará um fragmento de maiores dimensões e a perda de dois fragmentos menores | Diferença em três fragmentos |
| Inserção de DNA (sem novo local de restrição) num fragmento de restrição. | Os dois padrões considerados não irão variar no nº de fragmentos, mas na posição. A estirpe que ganhou novo DNA apresentará um fragmento de maiores dimensões. | Nenhuma diferença, apenas na posição |
| A deleção de DNA de um fragmento (sem alteração do nº de locais de restrição) | A estirpe que sofreu alteração apresentará um fragmento de menores dimensões. | Diferença em dois fragmentos |

Neste método as enzimas de restrição utilizadas são escolhidas de modo a assegurar a máxima variação genética dentro da população. Consequentemente, a variação que é obtida evolui rapidamente, muitas vezes por razões desconhecidas. Desta forma, este método torna-se útil para estudos de epidemiologia molecular de curto termo e não é adequado para estudos epidemiológicos globais (Maiden *et al*, 1998).

Clínica e patologias associadas a SGB

O SGB possui um polissacarídeo capsular que tem propriedades anti-fagocíticas, possibilitando que a bactéria infecte tecidos e induza respostas inflamatórias. O SGB é encontrado no tracto vaginal e cervical de mulheres portadoras e no muco das membranas uretrais no homem portador, assim como no aparelho gastrointestinal, com especial incidência no recto. A transmissão ocorre através de uma mãe portadora para o seu filho, aquando da passagem pelo canal de parto, estando também descrita a transmissão por via sexual nos adultos (Strahl *et al*, 2001).

As infecções mais comuns causadas por SGB são a sepsis neonatal, pneumonia e meningite. Nos adultos, as infecções por SGB incluem endometrioses *postpartum*, infecções do aparelho urinário, bacteriémia, infecções da pele e tecidos moles, pneumonia, endocardites, meningites, artrites e osteomielites. Os SGB estão também associados a infecções das extremidades em diabéticos (Henry, 1996).

Apesar do desenvolvimento das ciências médicas, o SGB continua a ser uma importante causa de mortalidade e morbilidade no recém-nascido. Os polissacarídeos capsulares,

que permitem a classificação das estirpes, e a proteína C contribuem para a virulência deste agente.

A infecção neonatal por SGB pode ser de início precoce e de início tardio. No primeiro caso, a doença manifesta-se nas primeiras 6 horas de vida, de uma forma mais ou menos inespecífica, com febre, dificuldade respiratória, icterícia e hipotensão, tendo uma mortalidade de cerca de 15%. Neste caso, a transmissão tem lugar durante a passagem do canal de parto. A doença de início tardio aparece em média aos 24 dias, com uma via de transmissão menos aparente e com predomínio de um quadro clínico de meningite (Graça, 2005).

A sepsis neonatal de início precoce ocorre em menos de 1% de nascimentos, mas esses casos resultam geralmente numa sequência fulminante de bacteriemia e sepsis, manifestando-se no 1º e 2º dia de vida. Esta doença devastadora gerou um movimento de enfoque na prevenção nas últimas duas décadas. O trabalho de Boyer e seus colaboradores nos anos 80 demonstrou a importância do uso de antibioterapia profilática, e em 1996 o CDC emitiu uma série de documentos orientadores, onde se indicava uma abordagem terapêutica baseada no risco materno (nascimentos prematuros, febre intra-parto superior a 38°C e ruptura de membranas mais de 18 horas anteriormente ao parto) ou no rastreio de SGB nas grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação (CDC, 1996).

A doença de início tardio pode aparecer após 4 ou 7 dias de vida. Neste caso a proveniência do organismo pode não ser necessariamente da flora vaginal e rectal da mãe. As fontes podem ser outros recém-nascidos infectados no berçário, as mãos dos

profissionais de saúde e ocasionalmente equipamentos contaminados (incubadoras, equipamento de ressuscitação, etc). Maioritariamente, e tal como se referiu anteriormente esta patologia é caracterizada pelo desenvolvimento de meningite (Shanson *et al*, 2000).

Num recém-nascido é mais provável que a meningite neonatal se desenvolva na primeira semana de vida do que após este período, havendo contudo um número significativo de casos de meningites tardias provocadas por SGB.

A todos os recém-nascidos que se apresentem com sintomas febris ou que não se alimentem bem, devem ser conduzidas imediatamente investigações que excluam a possibilidade de meningite ou septicémia por SGB. Outras manifestações clínicas incluem vómitos, letargia, alterações respiratórias, icterícia e diarreia. Os sinais clássicos de tensão das fontanelas, alterações de consciência e rigidez da nuca são sinais tardios que podem até em alguns casos não estar presentes. A meningite cursa normalmente com bacteriémia (Shanson *et al*, 2000).

Uma história de factores predisponentes está geralmente presente, e inclui complicações na gravidez como rotura prematura das membranas, um complicado parto por fórceps, asfixia durante o parto, uma infecção do aparelho genito-urinário da mãe ou um parto prematuro. Recém-nascidos com menos de 1000g de peso, nascidos com apenas 24-34 semanas de gestação, estão mais susceptíveis ao desenvolvimento de septicemias e meningites fatais provocadas por SGB do que recém-nascidos de termo com peso normal. A morte ocorre entre 40 a 75% dos casos e as complicações são comuns nos sobreviventes, apesar do tratamento e da cura (Shanson *et al*, 2000).

Antibioterapia

O uso profilático de antibióticos em mulheres colonizadas com SGB entre as 35 e as 37 semanas de gestação desempenha um papel importante na melhoria das complicações adjacentes à gravidez. Por exemplo, a utilização generalizada de profilaxia antibiótica intraparto para prevenção da infecção perinatal por SGB nos E.U.A. levou a um declínio de 70% das infecções neonatais precoces, uma das principais causas infecciosas de mortalidade neonatal por SGB (Shrag *et al*, 2000).

O uso profilático de antibióticos pode também ter resultados benéficos entre as mulheres com ruptura prematura das membranas, por diminuir ou eliminar a presença de bactérias e assim prevenir o desenvolvimento de processos infecciosos pela mãe e recém-nascido (Glass *et al*, 2005).

No entanto, a utilização profilática de antibióticos só é adequada se efectuada na altura correcta. A profilaxia pré-natal para erradicar a colonização por SGB antes do período de parto nunca foi recomendada, uma vez que estudos preliminares demonstraram que a erradicação era raramente atingida ou mantida (Glass *et al*, 2005).

As actuais directrizes de prevenção recomendam a pesquisa tardia (entre as 35 e 37 semanas) de SGB através de cultura microbiológica para todas as mulheres grávidas de termo, pois a profilaxia pré-natal, sem um rastreio prévio, originaria a utilização não justificada de um número elevado de antibióticos (Shrag *et al*, 2002).

No caso de parto prematuro, as recomendações de profilaxia antibiótica são mais complexas. Devido a este estar associado a um risco aumentado de doença neonatal por SGB, todas as mulheres não rastreadas que se apresentem em trabalho de parto prematuro devem receber profilaxia intraparto (Shrag *et al*, 2002).

Isolados de SGB com resistência confirmada à penicilina ou à ampicilina não foram observados até à data (CDC, 2002), pelo que a penicilina continua a ser o agente de escolha para a profilaxia antibiótica intraparto. A ampicilina é uma alternativa aceitável, mas a penicilina é preferível, porque tem um espectro mais restrito de actividade antimicrobiana e é menos susceptível de criar resistências nos microrganismos.

A eficácia da penicilina e da ampicilina intraparto como agentes para a prevenção da doença de início precoce no recém-nascido foi demonstrada em ensaios clínicos. Apesar de a via de administração intramuscular de penicilina ter sido avaliada, a administração intravenosa é a única via de administração recomendada como quimioprofilaxia intraparto para prevenir doenças perinatais provocadas por SGB, independentemente do antibiótico utilizado, devido à maior concentração intra-amniótica obtida com este método.

Em contrapartida, a proporção de isolados de SGB com resistência *in vitro* à eritromicina e à clindamicina tem aumentado desde 1996. O estudo da resistência a estes antibióticos reveste-se da maior importância, uma vez que são alternativas para grávidas alérgicas à penicilina (Shrag *et al*, 2002).

A utilização de vancomicina deve estar reservada para grávidas alérgicas à penicilina e para as quais a eritromicina ou a clindamicina não são opção, por apresentarem resistência *in vitro*. A sua utilização deve ser restrita devido às resistências emergentes à vancomicina noutros organismos de coloração Gram-positiva e à sua toxicidade.

A tetraciclina apresenta um amplo espectro de actividade, toxicidade e custos relativamente baixos, razões pelas quais foi largamente utilizada na década de 1970, tendo também surgido resistências, que obrigaram à restrição da sua utilização. Em espécies do género *Streptococcus*, foram descritos mecanismos de efluxo activo da droga e de protecção ribossomal, codificados por diferentes genes tet (Chopra *et al*, 2001). A maioria das estirpes de SGB apresenta resistência ou sensibilidade intermédia à tetraciclina, sendo por isso desaconselhado o uso profilático deste antibiótico (Fernandez *et al*, 1998).

Mecanismos de resistência

As bactérias resistentes aos macrólidos apresentam três mecanismos de resistência distintos, de acordo com o descrito na literatura: inactivação enzimática da eritromicina, modificação do sítio alvo e efluxo activo da droga. O primeiro mecanismo não foi detectado em estreptococos (Leclercq, *et al*, 1991; Wu, *et al*, 1997; Fitoussi, *et al*, 2001).

Nos SGB, a resistência à eritromicina está principalmente associada a dois mecanismos: modificação do sítio alvo e efluxo activo da droga. O primeiro é mediado por uma metilase ribossomal associada aos genes *erm* (“*erythromycin ribosome methylation*”)

(Seppala *et al*, 1998; Weisblum, 1995). Esta enzima adiciona dois grupos metil a um resíduo de adenina do rRNA 23S, o que provoca alterações configuracionais no ribossoma, levando a uma diminuição da ligação de macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (os quais, embora quimicamente distintos, apresentam mecanismos de acção e sítios alvo semelhantes). Este fenótipo de resistência é denominado MLS_B (macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B) e a produção da metilase pode ser constitutiva (quando é produzida sempre na célula) correspondendo ao fenótipo cMLS_B e geralmente associada ao genótipo *erm* (B) ou indutiva (em que é necessário um antibiótico indutor para a sua expressão), representando o fenótipo iMLS_B e associada ao genótipo *erm* (A). Estes fenótipos podem ser identificados pelo método do duplo disco (Seppala *et al*, 1998; Rosato *et al*, 1999).

O segundo mecanismo mantém os níveis de eritromicina baixos, através de um mecanismo de efluxo activo da droga, resultante da síntese de uma bomba de efluxo dependente de energia. Tal resistência está associada à expressão de um gene descrito como *mef* (“*macrolide efflux*”) (Clancy *et al*, 1996). As estirpes que possuem este gene apresentam o fenótipo M (macrólido), representativo de resistência apenas a macrólidos, sendo susceptíveis a lincosamidas e estreptograminas B (Roberts *et al*, 1999).

A resistência à clindamicina com sensibilidade à eritromicina foi descrita como associada ao gene *linB*, que codifica uma nucleotidiltransferase que inactiva o antibiótico por adenilação (Bozdogan *et al*, 1999).

Epidemiologia

SGB, emergiu durante a década de 1960 como uma importante causa de doença, e 10 anos depois era já considerada a 1ª causa de infecções no recém-nascido (Harper, 1971; Holt *et al*, 2001; Schuchat *et al*, 1998; Berner *et al*, 1998). Em aproximadamente 80% dos casos a infecção do recém-nascido por SGB é adquirida durante o parto, através de transmissão directa mãe-filho da bactéria que coloniza a mucosa anogenital de 25 a 40% das mulheres saudáveis (Schuchat, 1999).

É na década de 1990 que os investigadores se focam na prevenção desta infecção do recém-nascido e se inicia a utilização de profilaxia antibiótica intraparto nos EUA e Austrália, que originou uma diminuição significativa da infecção do recém-nascido (Schuchat, 1999).

No entanto, só em 1996 foram emitidas, nos EUA, as primeiras orientações consensuais para a prevenção das infecções por SGB. Desde então houve uma redução de 70% nas infecções de início precoce, mas não se registaram diminuições nas infecções tardias (CDC, 2005).

Em 2002, são emitidas novas orientações pelo CDC, recomendando: 1) uma estratégia de prevenção baseada apenas no rastreio, 2) um novo algoritmo para pacientes alérgicos à penicilina, e 3) práticas mais específicas em certos cenários clínicos (Gibbs *et al*, 2004).

Em 2002 nos EUA são registados apenas 2500 casos de infecção e 100 mortes anuais entre os recém-nascidos nos primeiros 3 meses de vida (CDC Report, 2002), cerca de metade das quais na primeira semana de vida. Mesmo assim, com a diminuição observada na incidência de casos de de infecção por SGB, alguns autores acreditam que a criação de uma vacina será o objectivo maior a atingir, com vista a uma ainda maior redução da incidência de infecção por SGB a longo prazo (Maione *et al*, 2005).

O interesse da criação de uma vacina para SGB é suportado pela observação de que o risco de infecção neonatal é inversamente proporcional à quantidade materna de anticorpos maternos contra os antígenos polissacarídeos específicos de SGB, tendo em conta que as imunoglobulinas G são transferidas através da placenta, da mãe para o filho, sendo importante por isso conhecer as características antigénicas das estirpes circulantes (Maione *et al*, 2005; Sinha *et al*, 2005).

Desde há muito que vêm a ser desenvolvidos estudos epidemiológicos, com caracterizações fenotípicas e genotípicas das estirpes circulantes associadas a perfis de resistência antimicrobiana. Com estes novos desenvolvimentos no sentido da criação de uma vacina reveste-se da maior importância ter conhecimento de quais as estirpes com maior prevalência em circulação, de forma a obter-se uma vacina que abranja o maior número possível de estirpes. Nesse sentido têm sido efectuados vários estudos que visam caracterizar diferentes populações, que se apresentam de seguida.

Em Portugal são poucos os estudos efectuados em SGB e não existem dados a nível nacional. Em 2007 foi publicado um estudo realizado na região de Lisboa, com estirpes colecionadas no período compreendido entre 2002 e 2004, que identificava como mais

prevalentes os serotipos capsulares III e V, representando em conjunto 44% das colonizações em grávidas de termo, enquanto que os serotipos Ia e III foram identificados como os mais prevalentes em casos de doença invasiva, representando 69% dos isolados (Martins *et al*, 2007).

Estes resultados foram concordantes com um estudo prévio realizado entre 1999 e 2002 num grande hospital de Lisboa, em que o serotipo capsular III foi identificado como o mais prevalente (24.6%), seguindo-se o V (23.4%), Ia (17.8%) e II (16.3%). Este estudo também abordou os perfis de resistência antimicrobiana, não identificando nenhuma estirpe resistente à penicilina, cloranfenicol, ofloxacina e vancomicina. Contudo foram encontradas resistências à tetraciclina (75.4%), à eritromicina (10.7%), e à clindamicina (9.9%). Dos 27 isolados eritromicino-resistentes, 70,4% detinham o fenótipo cMLS_B, 22,2% o fenótipo iMLS_B e 7,4% o fenótipo M. Todos os isolados com fenótipo M possuíam o gene *mef* (A), enquanto o gene *erm* (B) foi encontrado numa grande percentagem dos isolados MLS_B (n=17) e apenas um pequeno número de estirpes detinha o gene *erm* (A) (n = 7). Todos os isolados transportavam apenas um determinante de resistência a macrólidos (Figueira-Coelho *et al*, 2004).

Contudo, a distribuição mundial dos serotipos capsulares não parece ser homogénea. Nos Emiratos Árabes Unidos o serotipo IV foi identificado como sendo o mais prevalente, representando 26.3% dos casos, seguido do tipo Ia (21.0%), tipo III (17.6%) e tipo V (12.3%). Neste estudo, os autores inferiram que cerca de 10% das mulheres dos EAU estavam colonizadas por SGB (Amin *et al*, 2002).

Nos EUA a percentagem de colonização é indicada como sendo superior à da região da Arábia, estando estimada em cerca de 25% nas mulheres em idade fértil e em percentagem equivalente nos idosos saudáveis, população que nos EUA também é indicada como 40% da população infectada por SGB e que representa mais de 50% das mortes provocadas por infecção com SGB (Edwards *et al*, 2005).

Outro estudo realizado nos EUA apresenta o serotipo V como um serotipo emergente, sugerindo que existe variação ao longo do tempo das estirpes circulantes. Foram estudadas estirpes provenientes de infecções em adultos e recém-nascidos. Os serotipos predominantes nos casos de doença de início precoce no recém-nascido foram, o tipo III (38%), seguido dos tipos Ia (36%), V (13%) e II (11%). Na doença de início tardio a predominância foi também de tipo III (60%) seguido de Ia (23%). Na população adulta o tipo V representou 29% dos casos (Harrison *et al*, 1998).

Outro estudo efectuado no Zimbabué, a taxa de colonização em grávidas de termo foi de 31.6%. E as percentagens de serotipos capsulares foram as seguintes: tipo III (41.8%), o mais prevalente a que se seguiram o V (37.4%), Ia (11.0%), IV (3.3%), Ib (3.3%), II (1.0%) e 2.0% de estirpes não tipáveis. Neste estudo foi também realizada uma abordagem às resistências antimicrobianas, referindo os autores que todas as estirpes foram sensíveis à penicilina e resistentes à gentamicina (Moyo *et al*, 2000).

Em Itália o serotipo Ia foi associado a estirpes invasivas, enquanto que o serotipo V estava associado a estirpes recolhidas de mulheres colonizadas (Gherardi *et al*, 2007). Outro estudo realizado neste país indicou que a taxa de colonização em grávidas se aproximava dos 18% e que as estirpes pertencentes aos serotipos II, V e Ia eram as mais

prevalentes e as que apresentavam mais resistências aos macrólidos. Concluíram ainda que as estirpes serotípicamente semelhantes eram heterogêneas genotípicamente através de análise por PFGE (Savoia *et al*, 2008).

Na Finlândia, durante a década de 1990, foi realizado um estudo da população de SGB em isolados provenientes de crianças com menos de 3 meses infectadas por SGB, tendo sido apurados os seguintes valores de prevalências: tipo III (47%) tipo Ia (23%), tipo Ib (11%), tipo IV (8%), não tipáveis (7%), tipo II (6%), e tipo V (1%), concluindo os autores que uma vacina para SGB contendo pelo menos os conjugados dos serotipos Ia, Ib, II e III proporcionaria protecção a 88% das estirpes que causam doença neonatal na Finlândia (Kalliola *et al*, 1999).

Na mesma época na Suécia, os isolados invasivos provenientes de recém-nascidos apresentaram a seguinte distribuição para serotipos capsulares: tipo III (62%), tipo Ia (18%) e V (9%), enquanto na população adulta a distribuição foi a seguinte: tipo III (29%), tipo Ib (23%), tipo V (21%) e tipo II (15%). Na população de grávidas os serotipos mais frequentemente identificados como estirpes colonizadoras foram do tipo III (32%) e tipo V (22%), seguido do Ia (13%), Ib (13%) e II (11%). Os autores deste estudo concluíram assim que o serotipo III é o mais frequente na população sueca, indicando contudo que uma vacina contendo os 5 conjugados dos polissacarídeos capsulares mais comuns poderá ser a mais adequada para esta população (Berg *et al*, 2000).

No entanto, um estudo mais recente realizado também na Suécia dá conta de uma inversão das prevalências de serotipos capsulares provenientes de estirpes invasivas na

população adulta e um aumento significativo na população de recém-nascidos, onde se obtiveram as seguintes prevalências: tipo III (60%), tipo V (22%) e Ia (10%); e para a população adulta tipo V (42%) e III (25%). O serotipo V, tendo em conta estes resultados parece ter duplicado a sua frequência na população sueca em comparação com o estudo anterior. Os autores demonstraram que a vigilância activa dos serotipos capsulares circulantes é de extrema importância e que é difícil criar uma vacina anti-SGB polivalente no que diz respeito aos conjugados dos polissacarídeos capsulares (Persson *et al*, 2004).

Na Dinamarca foi também realizado um estudo com uma abrangência de 19 anos, desde 1984 a 2002, onde foram estudados 472 casos de doença invasiva por SGB em recém-nascidos, desde os 0 aos 90 dias de vida. A incidência de infecção foi de 0.4/1000 nados vivos. A maioria dos recém-nascidos (73%) teve uma infecção de início precoce com 53% destas registadas no primeiro dia de vida. O serotipo III foi o predominante (59%), sucedendo-se o Ia (16%), Ib (8%), não tipáveis (7%), II (6%) e outros (5%). Infecções recorrentes foram identificadas em 6 casos, com um intervalo compreendido entre 2 e 39 dias. Os serotipos isolados nos dois episódios foram idênticos (tipo III em cinco e tipo Ia num recém-nascido). Estes pares mostraram-se indistinguíveis nos testes de susceptibilidade aos antibióticos e por análise com PFGE (Ekelund *et al*, 2004).

No Reino Unido a incidência de infecções por SGB é de 0.74 casos por 1000 nados vivos e a mortalidade associada é de 8%. A partir de isolados provenientes de infecção no recém-nascido, os autores de um estudo apresentaram os seguintes valores para percentagens de serotipos capsulares: 48% (tipo III), 27% (tipo Ia), 10% (tipo V), 3% (não tipáveis) e 12% (tipos Ib, II, IV, VI, e VII no conjunto), dos quais o tipo III (38%),

Ia (32%), e V (13%) estiveram relacionados com a doença de início precoce. A doença de início tardio estava altamente associada ao tipo III (67%). Os isolados foram susceptíveis à penicilina e à ampicilina, mas 4% foram resistentes à eritromicina e 91% à tetraciclina. Os autores concluíram que uma vacina contendo os conjugados dos tipos III, Ia, e V seria teoricamente eficaz na cobertura de 85% dos casos de infecção do recém-nascido por SGB no Reino Unido (Weisner *et al*, 2004).

Em 2003 na Argentina, o serotipo III foi identificado como sendo o mais prevalente em doenças de início tardio, enquanto que a doença de início precoce foi associada a uma prevalência semelhante de vários serotipos (III, Ia e II). Os tipos II, Ia, III e IV foram associados à população adulta, com o tipo II a ser prevalente em adultos com idades compreendidas entre 18 e 69 anos e o tipo Ia em idosos (> 70 anos). A taxa de mortalidade calculada foi de 10,8%. Todas as estirpes se apresentaram susceptíveis à penicilina, 1,7% resistentes à clindamicina, 5,2% à eritromicina e 72,4% à tetraciclina (Lopardo *et al*, 2003).

Ainda na América do Sul, no Chile, e entre 1998 e 2002 foi efectuado um estudo com cerca de 100 isolados de diversas proveniências, que apurou os seguintes resultados: os serotipos Ia, II e III foram os mais predominantes representando 90% das estirpes, cinco isolados foram do tipo Ib (5%) e 2 do tipo V (2%). Não foram identificadas estirpes do tipo IV. Todas as estirpes apresentaram susceptibilidade à penicilina e à ampicilina e 4 apresentaram resistência à eritromicina e à clindamicina (4%). Estas estirpes tinham um fenótipo de resistência constitutiva cMSL_B e o gene *erm* (A) estava presente em todas (Martinez *et al*, 2004).

Na Coreia foi realizado um estudo a partir de 446 isolados de SGB entre 1990 e 2002, em que os serotipos capsulares apresentaram a seguinte distribuição: tipo III (36.5%), Ib (22.0%), V (21.1%), Ia (9.6%), VI (4.3%), II (1.8%), VIII (1.3%), IV (1.1%) e VII (0.9%). As taxas de resistência à eritromicina por serotipo foram 85% (V), 23% (III), 21% (VI), 3% (Ib) e 2% (Ia). Das 135 estirpes resistentes a eritromicina, 105 possuíam o gene *erm* (B), 20 o gene *mef* (A) e 7 o gene *erm* (TR); a maior parte dos isolados tipo V possuíam o gene *erm* (B), os do tipo Ib apresentavam uma distribuição igual dos genes de resistência e o tipo III representava 70% dos isolados que detinham o gene *mef* (A) (Uh *et al*, 2005).

Materiais e Métodos

População

Durante este trabalho foram estudadas amostras clínicas colhidas no Hospital Distrital de Santarém (HDS), no período compreendido entre 9 de Novembro de 2007 e 21 de Junho de 2008.

A presença de estreptococos do grupo B foi pesquisada em todas as grávidas seguidas na consulta externa de obstetrícia do HDS. A população de grávidas inclui todas as que se enquadram no grupo de gravidez de alto risco, quer seja por factores clínicos, quer por antecedentes familiares. Incluíram-se também neste estudo todos os isolados clínicos de estreptococos do grupo B, responsáveis por casos de infecção.

A pesquisa de SGB foi efectuada a 270 grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação, através de colheita em todas elas, de exsudados vaginais e rectais que foram posteriormente enviados para o laboratório de Microbiologia do HDS. *Estreptococos* do grupo B foi identificado em 57 grávidas, que constituíram as estirpes utilizadas neste estudo em conjunto com 15 duplicados de exsudados rectais e vaginais colhidos simultaneamente à mesma grávida, uma estirpe proveniente de uma infecção do tracto urinário por SGB e duas estirpes provenientes de septicémias por SGB, perfazendo um total de 75 isolados clínicos.

Metodologia de Investigação

Este trabalho foi concebido como um estudo descritivo simples porque, segundo Fortin (1996) tem como objectivo obter mais informação acerca de uma característica, a colonização e infecção por SGB. A sua finalidade é descrever essa característica com base em dados obtidos através de técnicas laboratoriais, pelo que se pode considerar um estudo descritivo com base experimental.

É também um estudo transversal, pois apenas irá retratar a realidade num determinado momento (Fortin, 1996), uma vez que foi realizada apenas uma colheita de produto biológico a cada indivíduo.

Métodos

As amostras biológicas foram colhidas a grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação nas consultas de obstetrícia, e consistiram em um exsudado vaginal e um exsudado rectal, colhidos em zaragatoas com meio de transporte.

No laboratório de microbiologia do HDS, cada zaragatoa foi inoculada em meio líquido de Todd-Hewitt para pré-incubação, em meio de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) e em meio de Granada (BD, Franklin Lakes, USA), os quais foram posteriormente incubados durante 18 horas, a 37° C, em atmosfera de aerobiose.

Após incubação, o meio líquido foi repicado para uma placa de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) e as colónias presentes nas placas, suspeitas de SGB foram grupadas para os serogrupos de Lancefield por um teste de aglutinação (Slidex Strepto Kit, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). Nas placas com meio de gelose Granada (BD, Franklin Lakes, USA), meio selectivo e diferencial para SGB, consideram-se colónias de SGB as que apresentavam pigmento laranja, conforme indicação do fabricante. No meio de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) consideram-se colónias suspeitas de SGB as colónias pequenas, não mucosas, que apresentam uma tonalidade entre o branco e acizentado com pequeno halo de hemólise (geralmente β -hemólise).

As colónias identificadas como SGB pelo teste de aglutinação foram de seguida confirmadas pelo método automático Vitek 2 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), tendo sido também realizados antibiogramas pelo mesmo método.

Após identificação conclusiva para SGB os isolados foram repicados para meio de conservação (meio de congelação) e armazenados a -80°C.

Isolamento e Identificação

As estirpes congeladas foram transportadas para o laboratório de bacteriologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT) tendo sido passadas para placas de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro

(Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) e incubadas durante 18 horas a 37° C em atmosfera de aerobiose.

Após incubação observaram-se as placas e sempre que estava presente mais de um tipo de colónias, procedeu-se ao isolamento das colónias suspeitas de serem SGB para nova placa de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). Nas placas em que apenas cresceu um tipo de colónias procedeu-se à sua identificação presuntiva através da observação das características das colónias.

A estes isolados foram realizados novos testes de confirmação para a identificação de SGB, que incluíram o teste de CAMP e a serogrupagem através de um teste de aglutinação para determinação do serogrupo B de Lancefield com o sistema comercial Slidex Strepto B (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), tendo sido registados os tipos de hemólise provocados pelas colónias.

Teste de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen)

Numa placa de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) inocularam-se, com uma ansa colónias de *Staphylococcus aureus*, por meio de uma estria em todo o diâmetro da placa. Perpendicularmente, a cerca de 0,5 cm, inocularam-se em estria as colónias suspeitas de *Streptococcus agalactiae* e incubou-se a placa durante 18h a 37° C em atmosfera de aerobiose. Após incubação observou-se o halo de hemólise, sendo que a formação de um halo em forma de seta no espaço entre as duas estrias indicavam a presença de *Streptococcus agalactiae* (Fig. nº1).

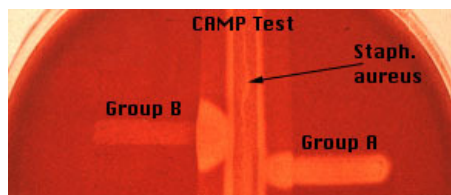


Figura 1: Halos de hemólise formados no teste de CAMP
(<http://www.medschool.lsuhs.edu/Microbiology/DMIP/camp.jpg>).

Serogrupagem

A partir das colónias suspeitas de SGB realizou-se um teste de aglutinação com partículas de látex (Slidex Strepto Kit, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) para serogrupagem de Lancefield. Em 200 µl de enzima de extracção inocularam-se duas a três colónias suspeitas de SGB e incubou-se por 15 minutos a 37° C. Após incubação, num cartão com fundo negro, colocou-se uma gota de reagente específico para cada um dos grupos de Lancefield (A, B, C, D, F e G) e adicionou-se 50 µl da solução de extracção com colónias a cada uma das gotas de reagente. Misturou-se e aguardou-se 1 minuto sob agitação suave até observação de aglutinação. Foram identificados como *Streptococcus* do grupo B aqueles que apenas aglutinaram na presença de anti-soro para SGB.

Confirmada a identificação de SGB, os isolados foram repicados novamente para meio de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) e incubados durante 18 horas a 37° C em atmosfera de aerobiose, de forma a obterem-se colónias em fase de crescimento óptimo para a realização de testes de susceptibilidade aos antibióticos (TSA) e serotipagem das estirpes de SGB por

aglutinação com partículas de látex, através da utilização do kit Essum GBS Serotyping Kit (Essum, Umea, Sweden).

TSA

Os testes de susceptibilidade aos antibióticos (TSA) realizaram-se através do método de difusão em ágar (Método de Kirby-Bauer), tendo o painel de antibióticos incluído penicilina, vancomicina, ofloxacina, tetraciclina, clindamicina e eritromicina (Oxoid Hampshire, UK). As características dos discos de antibiótico são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Antibióticos utilizados na determinação de perfis de susceptibilidade para *Streptococcus* spp.

| Antibiótico | Classe | Símbolo | Concentração ou Carga do Disco |
|--------------|------------------|---------|--------------------------------|
| Clindamicina | Lincosamidas | DA | 2 µg |
| Eritromicina | Macrólidos | E | 15 µg |
| Ofloxacina | Fluoroquinolonas | OFX | 5 µg |
| Penicilina | B-lactâmicos | G | 10 UI |
| Tetraciclina | Tetraciclinas | T | 30 µg |
| Vancomicina | Glicopeptideo | VA | 30 µg |

Fez-se uma suspensão das colónias isoladas em gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) em meio de Mueller-Hinton broth (Oxoid Hampshire, UK), de modo a obter-se uma suspensão comparável à escala 0,5 de MacFarland.

MATERIAS E MÉTODOS

Após 15 minutos mergulhou-se uma zaragatoa nessa suspensão e inocularam-se duas placas de Muller-Hinton com 5% de sangue (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Esta inoculação foi efectuada por exaustão em toda a placa.

Aguardaram-se 15 minutos e de seguida colocaram-se numa placa dois discos, um de clindamicina (DA) e outro de eritromicina (E), distanciados entre si cerca de um centímetro, para se verificar a existência de indutibilidade, através da formação de um halo em forma de “D”.

Na outra placa colocaram-se os restantes antibióticos: penicilina (P), ofloxacina (OFX), vancomicina (VA) e tetraciclina (TE).

A penicilina (P) e a tetraciclina (T) ficaram colocadas em lados opostos porque podem formar-se halos grandes, que podem interferir um com o outro, impedindo a leitura das suas dimensões.

Após incubação mediram-se e registaram-se os halos de inibição (de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* NCCLS) (ver tabela 3).

Tabela 3: Valores dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento (mm) para interpretação de susceptibilidade aos antibióticos por *Streptococcus* spp. excepto *S. pneumoniae* (NCCLS, 2004).

| Antibiótico | Diâmetro do halo (mm) | | |
|--------------|-----------------------|------------|-----------|
| | Resistente | Intermédio | Sensível |
| Clindamicina | ≤ 15 | 16-18 | ≥ 19 |
| Eritromicina | ≤ 15 | 16-20 | ≥ 21 |
| Ofloxacina | ≤ 12 | 13-15 | ≥ 16 |
| Penicilina | ≤ 19 | 20-27 | ≥ 28 |
| Tetraciclina | ≤ 18 | 19-22 | ≥ 23 |
| Vancomicina | ≤ 14 | 15-16 | ≥ 17 |

Serotipagem

Num cartão com fundo negro colocou-se uma gota de cada um dos reagentes (Ia, Ib, II, III, IV e V) contidos no sistema comercial Essum GBS Serotyping Kit (Essum, Umea, Sweden). A cada uma das gotas adicionaram-se de seguida duas a três colónias de *Streptococcus agalactiae* com uma ansa, misturou-se e aguardou-se 1 minuto sob agitação suave até observação de aglutinação e registaram-se os resultados.

Realizados estes testes laboratoriais seleccionaram-se para caracterização molecular por PFGE, as estirpes provenientes de exsudados vaginais e rectais recolhidos à mesma grávida, as que apresentaram padrão de resistência à eritromicina e/ou à clindamicina e

as estirpes invasivas. Estas estirpes foram enviadas em meio de congelação para o Laboratório Genética Molecular de Procariontes do Centro de Recursos Microbiológicos da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, onde foi realizado o estudo por PFGE.

Tipagem Molecular – PFGE (adaptado de Rato *et al*, 2008)

Materiais e composição das soluções utilizadas em Anexo I

Propagação das culturas

Propagaram-se culturas dos isolados (a partir de stocks conservados a -80°C) em meio de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) e incubaram-se durante 18h a 37° C em atmosfera de aerobiose, para isolamento de colónias. A partir das colónias obtidas, inocularam-se num tubo Falcon de 15ml, 6 ml de meio líquido Todd-Hewitt (Oxoid Hampshire, UK) o qual se incubou sem agitação, em aerobiose a 37°C durante a noite (no mínimo 17 horas).

Lavagem celular e ajuste da concentração celular

Centrifugaram-se cerca de 6 ml de cada uma das culturas em os tubos Falcon de 15ml durante 15 minutos a 4500 rpm à temperatura ambiente. De seguida removeu-se o sobrenadante e a cada um dos tubos adicionou-se 1ml de PIV. Ressuspenderam-se muito bem as células e centrifugou-se a suspensão durante 20 minutos a 4500 rpm. Ao fim deste tempo removeu-se o sobrenadante e ressuspenderam-se de novo as células em 200µl de PIV.

Procedeu-se então ao ajuste da concentração celular de cada cultura do seguinte modo: em cada *cuvette* com 1ml de PIV, adicionaram-se 5µl de suspensão celular. Leu-se a absorvância no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 620nm (os valores de absorvância aceitáveis devem variar entre 0,025cm⁻¹ e 0,15cm⁻¹). O ajuste da concentração celular foi adicionando PIV num volume tal que a densidade óptica da suspensão celular fosse de 5,0. O volume de PIV a adicionar foi obtido pela fórmula:

$$V_{add}(\mu l) = (DO \times 40 \times 210) - 210$$

V_{add}- Volume em (µl) de PIV a adicionar à suspensão celular.

DO- Densidade óptica a 620nm.

A quantidade de PIV a adicionar foi aferida tendo em consideração que o volume de suspensão celular no tubo *eppendorf* é de aproximadamente 210µl e tendo em atenção que o valor de absorvância registado corresponde a uma diluição de 5 µl de suspensão em 1ml de PIV.

Preparação dos discos de agarose

Preparou-se uma solução de agarose Seaplaque (Cambrex Bio Science, USA) a 1,5% em tampão PIV (sendo necessários 150µl de agarose por isolado). Entretanto, pipetaram-se 150µl de cada suspensão celular para um novo *eppendorf*, mantido a 42°C durante 10 minutos. Decorrido este tempo pipetaram-se 150 µl da solução de agarose previamente preparada, para a suspensão celular. A mistura foi bem ressuspensa.

Da mistura da suspensão celular em solução de agarose, retiraram-se amostras de 20 µl, que foram pipetadas para uma placa de vidro (forrada com *Parafilm* (American National Can, USA) e pré-lavada com etanol a 70°C) formando-se gotas.

Por cada isolado foram pipetadas 12 gotas, posteriormente cobertas com uma lâmina de vidro (pré-lavada com etanol a 70°C), de modo a que as gotas ficassem achatadas em forma de disco, com 1-2 mm de espessura. Os discos formados foram colocados a -20°C durante 5 minutos.

Lise celular

Megulharam-se os discos em 1ml de solução de lise [solução EC com Lisozima (Sigma-Aldrich, USA), mutanolisina (Sigma-Aldrich, USA) e RNase (Sigma-Aldrich, USA)] em tubo Falcon de 15ml e incubaram-se a 37°C durante 5 horas.

Desproteínização

Decantou-se a solução de lise e substituiu-se por 1ml da ESP (decantou-se com auxílio de gase esterilizada de forma a não se perderem os discos), após o que se incubou a 50°C durante 17 horas.

Lavagem para remoção da proteinase K

Decantou-se a solução ESP e lavaram-se cinco vezes os discos com 12 ml de tampão TE 1X, durante 30 minutos em agitação constante suave (decantou-se o líquido de cada vez com auxílio de gase esterilizada). Por fim, armazenaram-se os discos a 4°C em

tampão TE 1X. Identificaram-se os tubos com a designação da amostra e data de preparação.

Nessa altura, as células estavam lisadas, as proteínas e RNA degradados, encontrando-se o DNA cromossómico puro, imobilizado nas malhas da agarose. A conservação a 4°C permite a viabilidade dos discos durante meses.

Restrição do DNA com as enzimas *SmaI* ou *Cfr9I*

Para equilibrar os discos em tampão da enzima incubou-se um disco por isolado em 150 µl de solução tampão pré-*SmaI* (Invitrogen, USA) ou pré-*Cfr9I* (MBI Fermentas, Lithuania), durante 40 minutos à temperatura ambiente. De seguida, decantou-se o tampão de equilíbrio, substituiu-se por 50µl do mesmo tampão e adicionaram-se 20U (1µl) da respectiva enzima, por isolado, e incubaram-se os tubos a 30°C durante a noite. De forma a parar a restrição removeu-se a solução de restrição e substituiu-se por 5µl de tampão de arrastamento (com azul de bromofenol). Os discos foram armazenados a 4°C durante a preparação do gel.

Preparação do gel e inserção dos discos no gel

Prepararam-se 200 ml de agarose Seakem LE (FMC BioProducts, ME) a 1% em TBE 0,5X. Verteu-se a solução de agarose para o suporte do gel, tendo a atenção de conservar 2ml a 50°C para posterior utilização (selagem dos poços).

Nesse momento procedeu-se à lavagem do aparelho de PFGE (CHEF-DRIII, Chiller System, Bio-Rad). Enquanto o gel solidificava, o aparelho foi lavado, com 2L de água desmineralizada, durante 3 minutos, sendo este processo repetido por três vezes. Por fim, a água de lavagem foi substituída por tampão TBE 0,5X, que ficou a circular no aparelho, de modo a arrefecer até a sua temperatura atingir os 11,3°C.

- Após o gel solidificar, foram colocados os discos nos poços, com o auxílio de uma lamela e ansa azul, com atenção para que os discos não se danificassem e para que ficassem bem aderidos à parede frontal do poço e a meio do poço. Colocaram-se também os discos do padrão de pesos moleculares [Lambda Ladder PFG Marker, 50µg/ml (New England BioLabs, MA)] no primeiro e último poços e se necessário a meio do gel.

Em seguida selaram-se os poços com a mesma agarose usada para preparar o gel, mantida a 50°C. Colocou-se o gel no aparelho e iniciou-se o programa de electroforese pré-definido.

Condições de corrida: Temperatura: 11,3°C. Voltagem: de 200V (6V/cm). Tempo inicial de pulso: 5 segundos; Tempo final: 35 segundos; Tempo de corrida: 23 horas.

Após concretizada a corrida procedeu-se à coloração do gel e digitalização da imagem. Para tal, retirou-se o gel e corou-se em 500 ml de água com 25µl de solução de brometo de etídio (a 10mg/ml), durante 40 minutos. Após este tempo lavou-se o gel em água durante 15 minutos.

De seguida, colocou-se o gel num transiluminador (GelDoc, BioRad), captou-se e tratou-se a imagem, registando-se o resultado em suporte informático.

Elaboração de Dendrogramas

Os padrões de restrição gerados por PFGE foram comparados através da construção de dendrogramas, utilizando o sistema informático BioNumerics, Versão 4.0 (Applied Maths), disponível no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (ICAT). O coeficiente de semelhança utilizado foi o de “Dice” e o método de agrupamento foi o “UPGMA” (*Unweighed pair group method with arithmetic averages*). Foi utilizada uma optimização de 0.0% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição das bandas dos diferentes perfis de 1.5%.

Para análise dos dendrogramas foram utilizados os critérios de Tenover e colaboradores (2005), em que todos os isolados com o mesmo padrão de PFGE foram considerados idênticos ou a mesma estirpe. Os isolados com perfis de restrição com menos de 80% de semelhança foram considerados como possivelmente não relacionados genotipicamente e os isolados com perfis de restrição com 80% de semelhança ou superior foram considerados como possivelmente relacionados genotipicamente.

Deteção de Genes de Resistência aos Macrólidos

As estirpes identificadas como tendo resistência à eritromicina e clindamicina foram estudadas para os genes de resistência aos macrólidos (*erm* (A), *erm* (B) e *mef* (A)).

Após amplificação por *Polimerase Chain Reaction* (PCR) de sequências dos três genes os produtos de amplificação foram visualizados em electroforese em gel de agarose. As imagens obtidas dos géis foram captadas com o sistema GelDoc (BioRad),

Isolamento de DNA (adaptado de Klugman *et al*, 1998)

As amostras de DNA para PCR foram preparadas através da recolha, com uma ansa de 10µl, de inóculo da cultura bacteriana propagada em placa de Petri com meio de cultura sólido.

A propagação de colónias isoladas da estirpe de SGB a testar foi realizada em placas de meio gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), após incubação a 37 °C em aerobiose durante 18-24 horas.

Recolheu-se inóculo com ansa de 10µl. Seguidamente, procedeu-se à ressuspensão do conteúdo da ansa em 300 µl de 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) num tubo de 1,5 ml. Fechou-se o tubo e, com o auxílio de uma agulha, furou-se a tampa. Após 10 minutos de fervura da suspensão celular, esta foi centrifugada a 13000 rpm (5 min), após o que com uma micropipeta, se transferiu o sobrenadante que continha o DNA para novo tubo de 1,5 ml. Quando o DNA não foi utilizado de imediato, conservou-se a -20°C.

As misturas de reacção ('Master Mix') foram preparadas do seguinte modo:

- 1- Para **n** amostras, prepararam-se **n** microtubos de 200 μ l.
- 2- Separadamente, preparou-se um tubo de 1,5 ml com a 'Master Mix', que consistia em **n+1** volumes de cada um dos componentes da reacção (excepto DNA) descritos na tabela 4. A pipetagem foi efectuada do maior para o menor volume, Água 'Milli-Q' (esterizada), Tampão de reacção, solução de $MgCl_2$ (MBI Fermentas, Lithuania), dNTPs (MBI Fermentas, Lithuania), Primer FOR, Primer REV e *Taq* Polimerase (MBI Fermentas, Lithuania).
- 3- Agitou-se a 'Master Mix' no vórtex e centrifugou-se durante alguns segundos ('spin') na microcentrífuga de modo a recolherem-se todas as gotas espalhadas pelo tubo. Pipetaram-se então 49 μ l de Master Mix para cada microtubo de 200 μ l.
- 4- Pipetaram-se os DNAs para os respectivos tubos, os quais foram seguidamente colocados no termociclador (Modelo T-1, (Biometra, Germany)) pré-programado.

As condições de reacção de PCR, condições utilizadas no termociclador, primers e controlos utilizados no estudo dos genes de resistência a macrólidos são descritos nas Tabelas seguintes:

MATERIAS E MÉTODOS

Tabela 4: Condições de reacção de PCR para genes associados a resistência a Macrólidos (Pires *et al*, 2005).

| | mef (A) | | erm (A) | | erm (B) | |
|------------------------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| [Reagente] _i | [] _{final} | Volume (μl) | [] _{final} | Volume (μl) | [] _{final} | Volume (μl) |
| 10x Tampão de reacção | 1x | 5 | 1x | 5 | 1x | 5 |
| 25 mM dNTPs | 0,2 mM | 0,4 | 0,2 mM | 0,4 | 0,2 mM | 0,4 |
| 0,1 mM Primer FOR | 1 μM | 0,5 | 1 μM | 0,5 | 1 μM | 0,5 |
| 0,1 mM Primer REV | 1 μM | 0,5 | 1 μM | 0,5 | 1 μM | 0,5 |
| 5 U/μl <i>Taq</i> Polimerase | 1 U | 0,2 | 1 U | 0,2 | 2,5 U | 0,5 |
| 50 mM MgCl ₂ | 2,5 mM | 2,5 | 1,5 mM | 1,5 | 2 mM | 2 |
| DNA | - | 1 | - | 1 | - | 1 |
| Água Milli-Q | - | 39,9 | - | 40,9 | - | 40,1 |

[] final = a concentração final de cada reagente num volume de 50 μl

“Primer FOR” = *Primer Forward* (Directo); Primer REV = *Primer Reverse* (Reverso)

As reacções foram realizadas em 50 μl de volume

Tabela 5: Condições utilizadas no termociclador para amplificação por PCR de genes de resistência a Macrólidos.

| Gene | Desnaturação | | Desnaturação | | Emparelhamento | | Extensão | | Extensão | | Nº de Ciclos | Ref. Bibliográfica |
|----------------|--------------|----|--------------|-----|----------------|-----|----------|-----|----------|----|--------------|--------------------------------|
| | Inicial* | | | | | | | | final* | | | |
| | T | t | T | t | T | t | T | t | T | t | | |
| <i>mef</i> (A) | | | 94° | 30s | 58° | 60s | 72° | 80s | | | 40 | (Cresti <i>et al</i> , 2002) |
| <i>erm</i> (A) | | | 94° | 30s | 48° | 60s | 72° | 80s | | | 40 | (Cresti <i>et al</i> , 2002) |
| <i>erm</i> (B) | 94° | 5m | 94° | 30s | 53° | 30s | 72° | 90s | 72° | 7m | 30 | (Marchese <i>et al</i> , 1998) |

*Só ocorrem uma vez, não fazem parte dos ciclos de amplificação

Tabela 6: “Primers” ou sequências iniciadoras, utilizadas na detecção de genes de resistência a Macrólidos.

| “Primers” | Sequência 5’ para 3’ | Produto de amplificação | Ref. Bibliográfica |
|--|---------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| <i>mef</i> (A) FOR | GACCAAAAGCCACAATTGTGGA | 1432 pb | (Clancy <i>et al.</i> , 1996) |
| <i>mef</i> (A) REV | CCTCCTGTCTATAATCGCATG | 1432 pb | |
| <i>erm</i> (A) FOR | CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT | 590 pb | (Cresti <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>erm</i> (A) REV | CCCTGTTTACCCATTTATAAACG | 590 pb | |
| <i>erm</i> (B) FOR | GGAGTGATTACATGAACAAAAATA | 800 pb | (Cascone <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>erm</i> (B) REV | TTCCTTTTAGTAACGTGTAAC TTT | 800 pb | |
| “Primer FOR” = <i>Primer Forward</i> (Directo); Primer REV = <i>Primer Reverse</i> (Reverso) | | | |

Tabela 7: Estirpes Controlo das reacções de PCR.

| Genes | Controlos Positivos | Referência Bibliográfica |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| <i>erm</i> (A) | <i>Streptococcus pyogenes</i> A200 | (Seppälä <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>erm</i> (B) | <i>Streptococcus pyogenes</i> 18C22 | (Cresti <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>mef</i> (A) | <i>Streptococcus pyogenes</i> 1A77 | (Cresti <i>et al.</i> , 2002) |

Resultados

No período compreendido entre 9 de Novembro de 2007 e 21 de Junho de 2008, foram isoladas 75 estirpes de SGB no Laboratório de Microbiologia do HDS, das quais 72 eram provenientes de rastreios de SGB em exsudados vaginais e rectais de grávidas entre as 35 e as 37 semanas de gestação, correspondendo apenas a um total de 57 grávidas, uma vez que 15 apresentavam presença de SGB quer no exsudado vaginal quer no exsudado rectal, como resultado de colheita simultânea na mesma mulher do exsudado vaginal e rectal. Todas as 72 estirpes eram provenientes de colonização da flora bacteriana.

No período de recolha de amostras a prevalência de colonização por SGB em grávidas de 35 a 37 semanas de gestação no Hospital de Santarém era de 21.1%.

As restantes estirpes, recolhidas no mesmo período, corresponderam a uma estirpe isolada a partir de uma urina e duas estirpes isoladas a partir de hemoculturas, representando estirpes invasivas (ver Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição das estirpes estudadas quanto à origem.

| Origem | n |
|---|----|
| Exsudado Vaginal | 56 |
| Exsudado Rectal | 1 |
| Exsudado Rectal (duplicado de Exsudado Vaginal) | 15 |
| Hemocultura | 2 |
| Urina | 1 |
| Total | 75 |

RESULTADOS

A identificação de todos os isolados de SGB, realizada pelo método automático Vitek 2 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) no HDS, foi confirmada, no IHMT, utilizando o teste de CAMP e a serogrupagem através do teste de aglutinação para determinação do serogrupo B de Lancefield com o sistema comercial Slidex Strepto B (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

Também as placas de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), as placas com meio de Granada (BD, Franklin Lakes, USA) e a pré-incubação em meio líquido de Todd-Hewitt onde foram inoculadas as zaragatoas dos exsudados vaginais e rectais apresentaram resultados iguais.

Na Tabela 9 apresentam-se os resultados da serotipagem capsular utilizando o sistema comercial Essum GBS Serotyping Kit (Essum, Umea, Sweden).

Tabela 9: Distribuição de serotipos capsulares.

| Serotipo | n | % |
|-----------------|----|-------|
| Ia | 15 | 26,3 |
| Ib | 5 | 8,8 |
| II | 6 | 10,5 |
| III | 11 | 19,3 |
| IV | 9 | 15,8 |
| V | 10 | 17,55 |
| não serotipável | 1 | 1,75 |
| total | 57 | 100 |

As estirpes invasivas apresentaram os seguintes serotipos capsulares: a proveniente de uma infecção do aparelho urinário o serotipo III; e as provenientes de septicémia os serotipos Ia e III.

RESULTADOS

Os serotipos capsulares mais prevalentes dos isolados de colonização foram o Ia (26,3%) e III (19,3%), seguidos do V (17,55%), IV (15,8%), II (10,5%), Ib (8,8%). Apenas uma estirpe que não provocou reacção positiva com nenhum dos reagentes específicos para cada serotipo capsular, sendo considerada não serotipável.

As 15 estirpes provenientes de cada duplicação de exsudados rectais e vaginais, apresentaram o mesmo serotipo capsular.

Foram realizados testes de susceptibilidade aos antibióticos às 75 estirpes cujos resultados são descritos na tabela 10, estes resultados foram também coincidentes com os obtidos a partir do método automático Vitek 2 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

Tabela 10: Perfis de Susceptibilidade aos Antibióticos.

| Agentes Antimicrobianos | Perfis de Susceptibilidade | | |
|----------------------------|----------------------------|------------|------------|
| | n=60 (%) | | |
| | Susceptível | Intermédio | Resistente |
| Eritromicina | 54 (90) | 1 (1,7) | 5 (8,3) |
| Clindamicina | 55 (91,7) | 0 | 5 (8,3) |
| Ofloxacina | 60 (100) | 0 | 0 |
| Penicilina | 60 (100) | 0 | 0 |
| Vancomicina | 60 (100) | 0 | 0 |
| Tetraciclina | 11 (18,3) | 1(1,7) | 48 (80) |

Verificou-se que a maioria das estirpes era resistente à tetraciclina (80%) e susceptível à eritromicina (90%) e à clindamicina (91,7%). Todas as estirpes apresentaram susceptibilidade à ofloxacina, à penicilina e à vancomicina.

RESULTADOS

Também se verificou que todas as estirpes com resistência quer à eritromicina ou à clindamicina acumulavam resistência à tetraciclina.

As estirpes provenientes de cada duplicação de exsudados rectais e vaginais, apresentaram o mesmo perfil de susceptibilidade.

.

Para validação dos resultados obtidos para os TSA realizou-se um controlo dos discos de antibiótico utilizando uma estirpe ATCC de *Staphylococcus aureus*, tendo-se obtido os resultados concordantes com os descritos para estirpe em causa, confirmando assim a fiabilidade dos resultados dos TSA realizados (ver Tabela 11).

Tabela 11: Resultados em cm dos halos de inibição produzidos para a estirpe controlo.

| Estirpe Controlo | E | DA | OFX | G | VA | T |
|------------------|----|----|-----|----|----|----|
| ATCC 25923 | 26 | 25 | 25 | 32 | 15 | 23 |

Para tipagem molecular por PFGE, seleccionaram-se as estirpes provenientes de exsudados vaginais e rectais da mesma grávida, as que apresentaram padrão de resistência à eritromicina e/ou à clindamicina e as estirpes invasivas. As imagens dos géis obtidos são apresentadas no Anexo II.

RESULTADOS

Apresenta-se de seguida, como exemplo, a imagem de um gel representando estirpes clonais e não clonais, por PFGE (Figura 2).

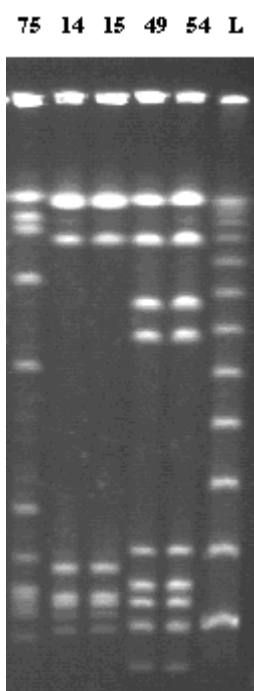


Figura 2: Gel de PFGE com 4 estirpes de SGB

L = λ Ladder.

A estirpe correspondente à amostra 75 na imagem representa um isolado não clonal em relação aos outros quatro e os isolados com os códigos 14 e 15 representam estirpes clonais entre si, assim como as estirpes com os códigos 49 e 54 (ver Figura 2).

RESULTADOS

A partir dos perfis de restrição obtidos por PFGE construiu-se um dendrograma (Figura 3) com todos os isolados de SGB seleccionados para o estudo de clonalidade (ver pág. 34).

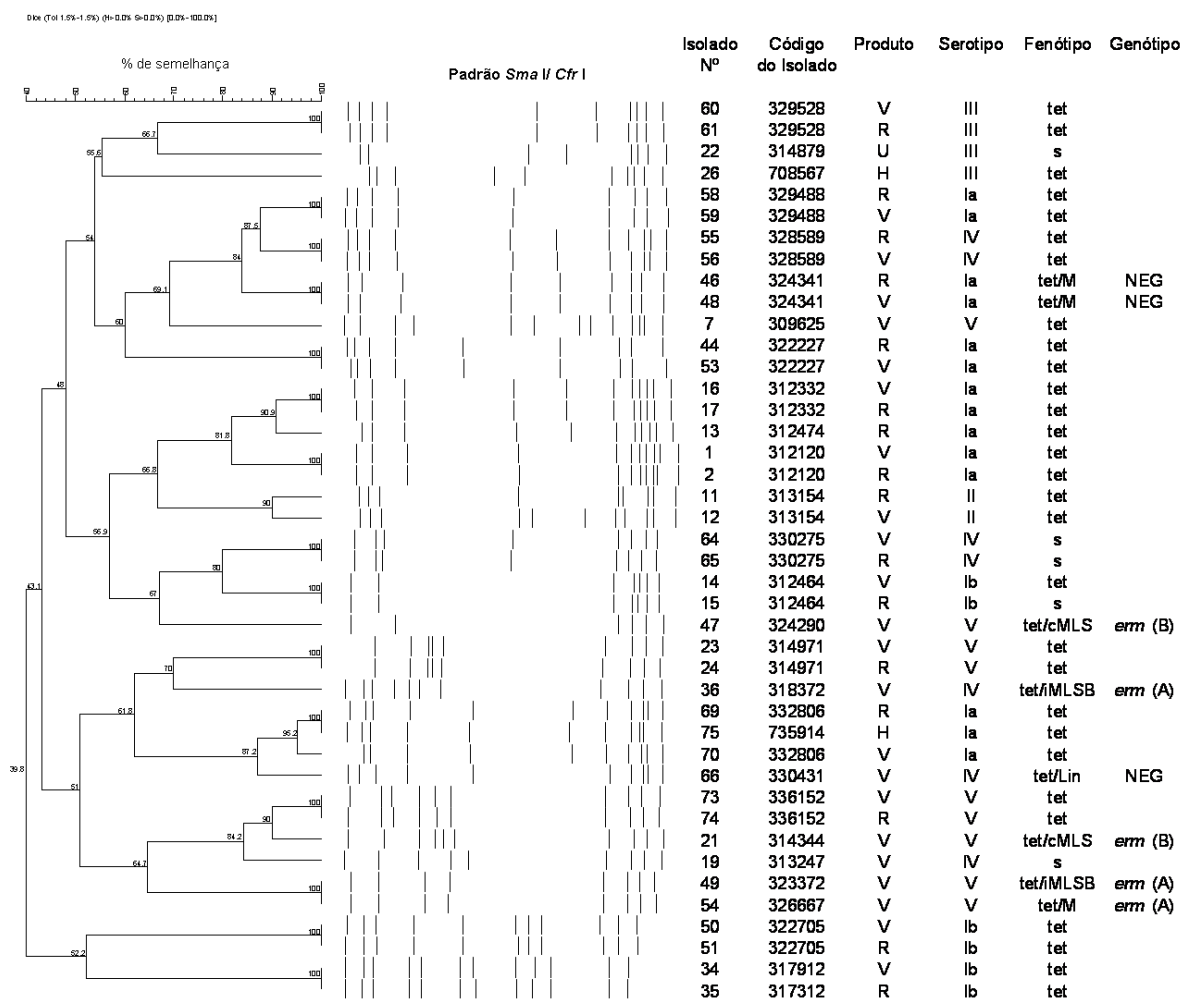


Figura 3: Dendrograma construído com todos os padrões de SmaI/ CfrI gerados por PFGE em SGB.

As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] – O coeficiente de semelhança utilizada foi o de “Dice” e o método de agrupamento foi o “UPGMA” (*Unweighed pair group method with arithmetic averages*). Foi utilizada uma optimização de 0.0% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição das bandas dos diferentes perfis de 1.5%.

RESULTADOS

Pela observação das percentagens de semelhança entre as estirpes podemos verificar que cada duplicado das estirpes de SGB provenientes simultaneamente de exsudados rectais e vaginais apresentaram uma percentagem de semelhança de 100% com o correspondente exsudado vaginal.

Encontra-se ainda uma percentagem de semelhança de 100% entre a estirpe nº 75 proveniente de uma hemocultura de recém-nascido e a estirpe nº 69 proveniente de um exsudado rectal de uma grávida, embora a grávida e o recém-nascido não serem mãe e filho. A estirpe nº 75 é proveniente de um recém-nascido que não nasceu no HDS, cuja mãe não tinha sido rastreada, tendo sido internado por sepsis de início tardio provocada por SGB.

Na Figura 4 apresenta-se um novo dendrograma onde estão representadas todas as estirpes, com excepção das 15 referentes aos duplicados de exsudados rectais de grávidas com exsudados vaginais positivos.

RESULTADOS

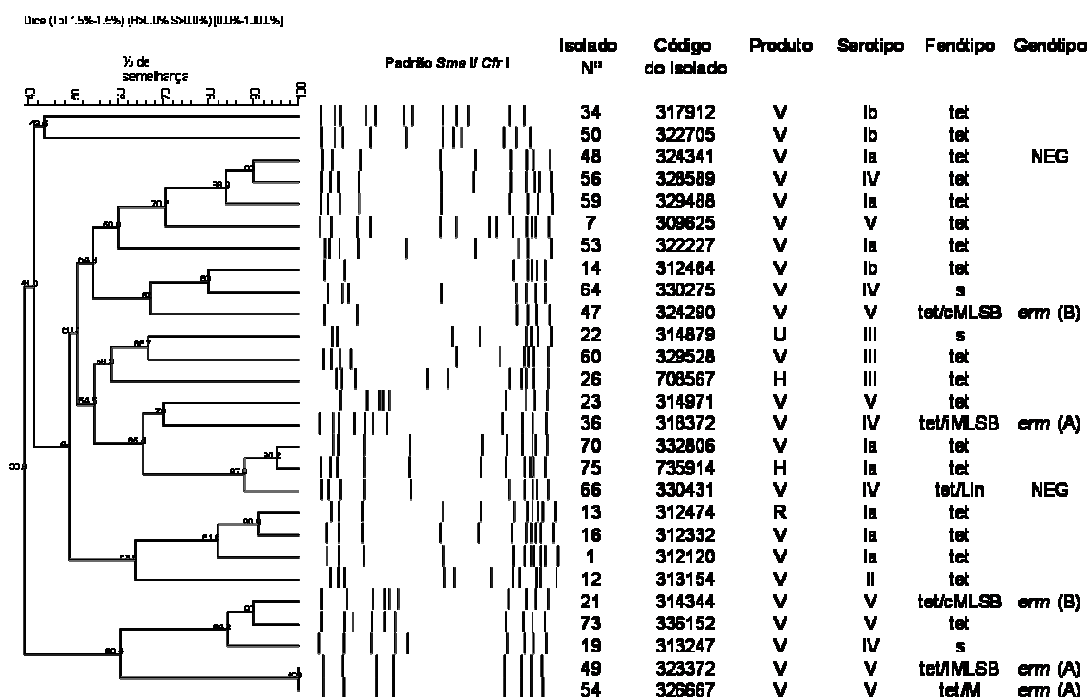


Figura 4: Dendrograma construído com os padrões de SmaI/CfrI gerados por PFGE em SGB, provenientes de diferentes grávidas.

As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] – O coeficiente de semelhança utilizada foi o de “Dice” e o método de agrupamento foi o “UPGMA” (*Unweighed pair group method with arithmetic averages*). Foi utilizada uma optimização de 0.0% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição das bandas dos diferentes perfis de 1.5%.

Neste dendrograma, utilizando os critérios definidos por Tenover e colaboradores (2005), observaram-se seis grupos epidemiologicamente relacionados ou “clusters”. Quatro destes “clusters” incluem três isolados, enquanto que os outros dois incluem apenas dois isolados. Destes, há um “cluster” que possui a particularidade de as suas duas estirpes apresentarem uma percentagem de semelhança de 100% (a estirpe 49 e 54). Estas duas estirpes apresentam também o mesmo serotipo e genótipo de resistência, tendo contudo um fenótipo de resistência aos antibióticos diferente, respectivamente iMLS_B e M.

RESULTADOS

Neste dendograma observa-se que as três estirpes invasivas se encontram a uma percentagem de semelhança inferior a 80% (entre 54,5% e 58,3%).

Por este dendrograma verifica-se que existe uma grande heterogeneidade ou policlonalidade entre os isolados estudados, uma vez que existem quase tantos padrões de PFGE quanto o número de isolados.

Detecção de Genes de Resistência aos Macrólidos

Foram estudados os genótipos de resistência aos antibióticos em todas as estirpes resistentes ou de resistência intermédia à eritromicina e à clindamicina (estirpes nº: 21; 36; 46; 47; 48; 49; 54 e 66), independentemente da sua origem.

Para tal, realizaram-se reacções de PCR para amplificação dos genes *erm* (A), *erm* (B) e *mef* (A). Os resultados negativos foram confirmados por repetição das reacções de PCR. Na Tabela 12 apresentam-se os resultados obtidos para os serotipos capsulares, perfis de resistência aos antibióticos e genótipos de resistência.

Tabela 12. Características dos isolados de SGB, de diferentes origens clínicas quanto ao serotipo, perfil de resistência a antibióticos, fenótipos e genótipos de resistência aos macrólidos.

| Isolado N° | Código do Isolado | Produto | Serotipo | E | DA | OFX | G | VA | T | Fenótipo | Genótipo |
|------------|-------------------|---------|----------|----|----|-----|---|----|---|-----------|----------------|
| 21 | 314344 | V | V | R | R | S | S | S | R | tet/cMLSB | <i>erm</i> (B) |
| 36 | 318372 | V | IV | RD | RD | S | S | S | R | tet/iMLSB | <i>erm</i> (A) |
| 46 | 324341 | R' | Ia | I | S | S | S | S | R | tet/M | |
| 47 | 324290 | V | V | R | R | S | S | S | R | tet/cMLSB | <i>erm</i> (B) |
| 48 | 324341 | V | Ia | I | S | S | S | S | R | tet/M | |
| 49 | 323372 | V | V | RD | RD | S | S | S | R | tet/iMLSB | <i>erm</i> (A) |
| 54 | 326667 | V | V | R | S | S | S | S | R | tet/M | <i>erm</i> (A) |
| 66 | 330431 | V | IV | S | R | S | S | S | R | tet/Lin | |

Legenda: V – exsudado vaginal

R' – exsudado rectal

tet – resistência à tetraciclina

tet/cMLSB – resistência à tetraciclina e resistência constitutiva a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas

tet/iMLSB – resistência à tetraciclina e resistência induzida a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas

tet/Lin resistência à tetraciclina e lincosamidas

S – susceptível a todos os antibióticos estudados

R – resistente

RD – resistente, com formação de halo em forma de “D”

RESULTADOS

Pela análise desta Tabela, verifica-se que todas as amostras apresentam resistência à tetraciclina (tet). Metade do número das estirpes estudadas é concomitantemente resistente à eritromicina e à clindamicina (n=4) e destas, 50% apresenta um fenótipo de resistência constitutiva aos macrólidos e 50% resistência induzida aos macrólidos, estando de acordo com os genótipos, *erm* (B) e *erm* (A) respectivamente. Contudo em alguns isolados não se encontra a correlação esperada entre fenótipo e genótipo de resistência aos macrólidos, como se expõe de seguida.

As estirpes referentes às amostras nº 46 e nº 48 apresentam um fenótipo de resistência intermédia à eritromicina indicando a possível presença de um gene de resistência aos macrólidos, contudo de entre os genes pesquisados, nenhum foi detectado. Importa referir que estas amostras correspondem a um exsudado vaginal e rectal provenientes da mesma grávida, são consideradas a mesma estirpe pela análise do seu serotipo capsular e perfil de PFGE, o que também está de acordo com os iguais perfis de resistência aos antibióticos e com o resultados da genotipagem das resistências aos macrólidos.

A estirpe nº 54 apresenta um perfil de resistência à eritromicina com sensibilidade aos restantes antibióticos estudados, contudo é de referir que apesar de ser sensível à clindamicina, no seu genótipo foi detectado o gene *erm* (A).

A estirpe nº 66 apenas apresenta resistência à clindamicina indicando um fenótipo de resistência ao grupo das lincosamidas (Lin) e sensibilidade ao macrólidos, e como esperado não estava presente nenhum dos genes estudados.

RESULTADOS

De todas as estirpes que apresentam perfis de resistência quer à eritromicina, quer à clindamicina, verificamos que quatro delas possuem o serotipo capsular V, duas o serotipo capsular IV e uma o serotipo capsular Ia (na realidade são os dois isolados nº 46 e nº 48).

Na figura 5 são apresentadas imagens representativas dos géis com produtos de PCR dos genes de resistência aos macrólidos. Os géis com os resultados das estirpes estudadas são apresentados no Anexo III.

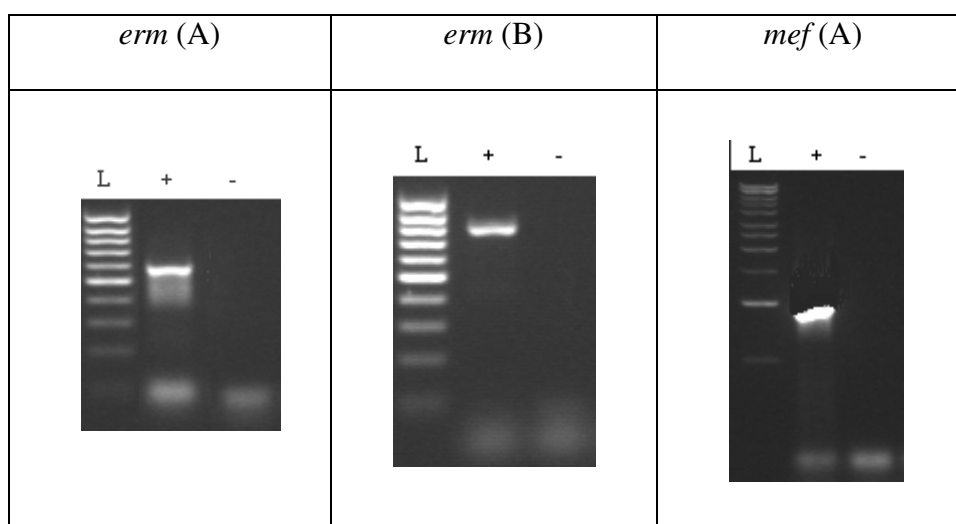


Figura 5: Fotografias representativas de produtos de amplificação, dos genes de resistência a macrólidos, por PCR.

L = λ Ladder; + = presença do gene; - = ausência do gene

Os resultados globais obtidos para cada uma das 75 estirpes de SGB, referentes à identificação TSA, serotipagem e genotipagem dos genes de resistência, podem ser encontrados no Anexo IV.

Discussão e conclusões

Apesar do desenvolvimento das ciências médicas e laboratoriais, o SGB continua a ser uma importante causa de mortalidade e morbilidade no recém-nascido (Graça, 2005), sendo importante conhecer os seus mecanismos de patogénese, a sua distribuição na população, bem como as características fenotípicas e genotípicas das estirpes circulantes, mantendo um registo actualizado das resistências bacterianas presentes ao longo do tempo.

O SGB é encontrado no aparelho vaginal e cervical de mulheres portadoras, assim como no aparelho gastrointestinal (com especial incidência no recto) (Strahl *et al*, 2001). Em aproximadamente 80% dos casos, a infecção do recém-nascido por SGB é adquirida durante o parto através de transmissão directa mãe-filho da bactéria que coloniza a mucosa anogenital de 25 a 40% das mulheres saudáveis (Schuchat, 1999). Por este motivo, desde o ano de 2002 que o CDC recomenda uma estratégia de rastreio universal da colonização de SGB na flora vaginal e rectal de todas as mulheres grávidas, entre as 35 e 37 semanas de gestação.

Esta estratégia de pesquisa serviu de base a este estudo, pela sua ampla aceitação e aplicação nos serviços hospitalares e clínicos que acompanham mulheres grávidas, permitindo uma normalização dos procedimentos de pesquisa e identificação de SGB levando à possibilidade de comparação de resultados e estudos em vários países.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo, mediante a adopção da estratégia do CDC, foram identificadas no Hospital Distrital de Santarém, 57 grávidas portadoras de SGB na sua flora genital, no período compreendido entre 9 de Novembro de 2007 e 21 de Junho de 2008 num total de 270 grávidas estudadas, indicando uma prevalência de 21.1%, o que está de acordo com outros estudos.

Por exemplo nos EUA a percentagem de colonização é estimada em cerca de 25% nas mulheres em idade fértil (Edwards *et al*, 2005; CDC, 2002), na Polónia de 19.7% (Kowalska *et al*, 2003), na Tailândia de 16% (Tor-Udom *et al*, 2006), em Itália de 18% (Savoia *et al*, 2008). Contudo, no Zimbabué, a taxa de colonização em grávidas de termo foi de 31.6% (Moyo *et al*, 2000), sensivelmente 10% mais elevada do que a da generalidade dos outros países anteriormente referidos, o que pode dar indicações de uma relação entre a taxa de colonização e as condições sociais a que as populações estão sujeitas.

Não existem estudos realizados em Portugal, que indiquem o valor da prevalência de colonização por SGB em grávidas não permitindo uma comparação com o valor obtido neste estudo.

Em relação aos métodos de isolamento e crescimento de colónias de SGB a partir dos exsudados vaginais e rectais podemos inferir que estes são igualmente sensíveis e específicos, uma vez que os resultados obtidos foram sempre concordantes quer utilizando as placas com meio de Granada (BD, Franklin Lakes, USA), quer a pré-incubação em meio líquido de Todd-Hewitt seguida de incubação placas de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Este

facto de não se encontrarem diferenças significativas entre os dois métodos é corroborado por alguns autores (de la Rosa *et al*, 1992; Garcia Gil *et al*, 1999; Rosa-Fraile *et al*, 1999), embora outros tenham concluído que o meio de Granada é menos sensível em cerca de 2% (estirpes não produtoras de pigmento carotenóide) do que o método de inoculação em meio enriquecido seguido de uma subcultura para gelose de sangue (Gupta *et al*, 2004).

É de referir que neste estudo os exsudados vaginais e rectais também foram inoculados directamente em placas de gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) sem incubação prévia em meio líquido de Todd-Hewitt e os resultados obtidos foram equivalentes aos dois métodos anteriores. Os nossos resultados podem pois ser consequência do reduzido número de amostras, uma vez que era expectável que neste caso a taxa de detecção fosse inferior. O CDC refere que quando se utiliza a inoculação directa em meio de gelose de sangue sem pré-incubação em meio líquido de enriquecimento, 50% das grávidas portadoras de SGB apresenta resultados culturais falsos-negativos (CDC, 2002).

A presença de SGB nas 57 grávidas foi confirmada pela utilização de diferentes métodos como, o método automático Vitek 2 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), realizado no HDS, os métodos manuais de serogrupagem através do teste de aglutinação para determinação do serogrupo B de Lancefield com o sistema comercial Slidex Strepto B (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) e do teste de CAMP, realizados no IHMT. A concordância obtida entre os três métodos permite afirmar qualquer um deles parece ser um método fiável para a identificação de SGB.

É de referir que o método automático também apresentou concordância com os TSA realizados pelo método de Kirby-Bauer, evidenciando-se como o método preferencial na prática hospitalar pelas vantagens de redução de pessoal e de tempo até emissão do resultado.

Quanto à prevalência dos serotipos capsulares na população estudada, os resultados obtidos, Ia (26,3%), III (19,3%), V (17,55%), IV (15,8%), II (10,5%), Ib (8,8%), quando comparados, uma vez que não existem estudos de âmbito nacional, com os resultados de outros estudos realizados em Portugal (Figueira-Coelho *et al*, 2004; Martins *et al*, 2007), verificamos que o serotipo capsular III foi identificado como o mais prevalente (24.6%), seguindo-se o V (23.4%), Ia (17.8%) e II (16.3%), demonstrando que na região de Lisboa e Vale do Tejo os 3 serotipos mais prevalentes são os serotipos capsulares Ia, III e V oscilando as suas prevalências entre os 15 e os 25%. Devem ser efectuados estudos noutras regiões do país de modo a verificar se existe variabilidade geográfica, nas características das estirpes de SGB isoladas.

Noutros países também se encontram relações semelhantes. No Zimbabué, os serotipos mais prevalentes foram o tipo III (41.8%), V (37.4%) e Ia (11.0%) (Moyo *et al*, 2000), na Finlândia, o tipo III (47%) Ia (23%) e Ib (11%) (Kalliola *et al*, 1999). Na Suécia num estudo na população adulta o tipo III (29%) foi o mais prevalente, seguido de Ib (23%), V (21%) e II (15%) (Berg *et al*, 2000), embora nesta zona um outro estudo tivesse apresentado uma inversão de prevalências, com os tipos V (42%) e III (25%) a serem os mais frequentemente encontrados (Persson *et al*, 2004). Na Coreia os serotipos capsulares apresentaram a seguinte distribuição: tipo III (36.5%), seguido de Ib (22.0%)

e V (21.1%) (Uh *et al*, 2005) e na Itália os serotipos mais prevalentes foram Ia, II e V (Savoia *et al*, 2008).

Na população objecto deste estudo verificou-se também uma prevalência considerável do serotipo IV, sendo que existem outras regiões onde este é o serotipo mais frequente, como é o caso dos Emiratos Árabes Unidos, com uma prevalência de 26,3% seguido dos serotipos Ia, III e V, com prevalências entre os 15 e 20% (Amin *et al*, 2002).

Desta análise da distribuição dos serotipos capsulares em várias zonas do globo, com diferentes índices de desenvolvimento, podemos verificar que o serotipos capsulares mais frequentes são os serotipos III e V, havendo ainda assim uma variabilidade considerável na ordem de prevalência dos vários serotipos capsulares.

Utilizando esta informação global conjugada com os dados obtidos na região de Lisboa e Santarém podemos afirmar que no contexto de criação de uma vacina de conjugados aplicável à população portuguesa, esta deveria conter os conjugados dos tipos III, Ia, e V que cobririam grande parte da população (aproximadamente 65%), este modelo de vacina é também preconizado para outros países como o Reino Unido (Weisner *et al*, 2004), indicando a hipótese de este conjunto de conjugados ser adoptado por vários países o que facilitaria a sua produção e comercialização. No caso português a vacina poderia aproximar-se de uma cobertura quase total se contivesse ainda os conjugados do tipo II e IV. No entanto, e dado o número de amostras utilizadas neste estudo aconselhar-se-ia um estudo mais abrangente do ponto de vista geográfico e do número de amostras estudadas de forma a confirmar esta teoria.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

É importante referir que na generalidade dos estudos citados os serotipos capsulares dos tipos Ia, III e V eram os mais associados à maior parte dos casos de infecção no recém-nascido, sendo este mais um argumento para incluir conjugados destes tipos capsulares numa possível vacina. Neste estudo não se podem tirar conclusões no que diz respeito aos serotipos das estirpes invasivas, uma vez que o número de estirpes invasivas é tão reduzido que não permite sustentar qualquer relação entre serotipos capsulares e estirpes invasivas, aconselhando-se mais uma vez um estudo mais abrangente e espaçado no tempo de forma a poder incluir casos de doença invasiva do recém-nascido.

Deve ser referido que utilizando a técnica de PFGE como método de tipagem molecular para avaliar a clonalidade entre os isolados, verificou-se que a população de SGB é bastante heterogénea no que diz respeito à sua clonalidade, apesar de se terem sido definidos seis “clusters” de estirpes epidemiologicamente relacionadas (percentagens de semelhança superiores a 80%). Contudo entre as estirpes que fazem parte de cada um destes “clusters” são encontradas variações consideráveis, de serotipos capsulares e fenótipos de resistência, indicando que apesar de terem um possível ancestral comum sofreram mutações relevantes que alteraram as suas características fenotípicas, sugerindo a necessidade de uma vigilância continuada para caracterização das estirpes circulantes.

Através dos resultados de PFGE conclui-se também que não existe relação clara e evidente entre a proximidade genética, os serotipos capsulares e os fenótipos de resistência aos antibióticos, indicando que todas estas características devem sempre ser estudadas, o que está de acordo com outros estudos (Domelier *et al*, 2008). Por outro lado parece não existir uma relação, entre serótipos e clones, visto que observamos que

estirpes serotípicamente semelhantes são heterogêneas genotípicamente o que também está de acordo com outros estudos (Savoia *et al*, 2008).

Os resultados obtidos por PFGE, devem ser complementados com outra técnica, como o MLST (www.mlst.net/) o que permitiria avaliar a relação entre os isolados considerados não relacionados por PFGE. O MLST permite definir linhagens genéticas, e adicionalmente disponibiliza-as num banco de dados, possibilitando assim uma comparação com isolados provenientes de outras populações temporal e geograficamente distintas (Luan *et al*, 2005; Gherardi *et al*, 2007).

Ainda pela análise dos perfis de restrição gerados por PFGE, verificámos que cada duplicado das estirpes provenientes simultaneamente de exsudados rectais e vaginais, recolhidos à mesma grávida apresentaram uma percentagem de semelhança de 100%, o que está de acordo com os resultados da serotipagem e da susceptibilidade aos antibióticos. Esta concordância entre as estirpes colonizantes da flora anal e genital da mesma mulher é importante no contexto de profilaxia antibiótica, uma vez que exclui a probabilidade de a mesma mulher possuir na sua flora duas estirpes com resistências diferentes aos antibióticos.

No contexto da prevenção da infecção por SGB é de realçar que o uso profilático de antibióticos em mulheres colonizadas com SGB entre as 35 e as 37 semanas de gestação pode desempenhar um papel importante na melhoria das complicações adjacentes à gravidez dessas mulheres. Por isso, a utilização generalizada, a partir de 1996, de profilaxia antibiótica intraparto para prevenção da infecção perinatal por SGB nos

E.U.A. levou a um declínio de 70% das infecções neonatais precoces, uma das principais causas infecciosas de mortalidade neonatal por SGB (Shrag *et al*, 2000).

Os antibióticos de eleição são a penicilina e a ampicilina administrados intraparto, cuja eficácia como agentes para a prevenção da doença de início precoce no recém-nascido foi demonstrada em ensaios clínicos, sendo preferível a utilização de penicilina dado ser menos propícia à selecção de microorganismos resistentes (CDC, 2002). Assim, deve ser tida em consideração a possibilidade de aumento de resistências dos bacilos de coloração de Gram negativa, como a *Escherichia coli*, tal como referido pelo CDC (2002), que recomenda uma vigilância destas resistências.

Em contrapartida, a proporção de isolados de SGB com resistência *in vitro* à eritromicina e à clindamicina tem aumentado desde 1996. O estudo da resistência destes antibióticos reveste-se da maior importância, uma vez que são alternativas para grávidas alérgicas à penicilina (Shrag *et al*, 2002).

No presente estudo verificou-se que a percentagem de estirpes resistentes quer à eritromicina, quer à clindamicina era de apenas cerca de 8% o que se assemelha dos valores obtidos no estudo anteriormente referido e efectuado num hospital de Lisboa, onde foram encontrados valores próximos a 10% para resistência a estes antibióticos. Os valores obtidos no que diz respeito à resistência à tetraciclina (80%) são semelhantes aos 75,4%, encontrados nessa população de Lisboa (Figueira-Coelho *et al*, 2004). Contudo, não existem dados que abranjam todo o território português, limitando esta análise das resistências aos antibióticos à região aqui citada.

É de referir que todas as estirpes estudadas apresentaram sensibilidade à penicilina, vancomicina e ofloxacina, confirmando a penicilina como antibiótico de eleição para a prevenção da infecção por SGB.

A sensibilidade à penicilina tem sido referida em quase todos os estudos anteriormente citados: no Reino Unido todos os isolados foram susceptíveis à penicilina e à ampicilina, 4% foram resistentes à eritromicina e 91% à tetraciclina (Weisner *et al*, 2004); no Chile, todas as estirpes apresentaram susceptibilidade à penicilina e à ampicilina, sendo que 4 isolados apresentaram resistência à eritromicina e à clindamicina (4%) (Martinez *et al*, 2004).

O CDC (CDC, 2002) aconselha a utilização da penicilina e tendo em conta os dois estudos efectuados em Portugal torna-se necessário sensibilizar os clínicos em geral para a possível utilização abusiva de macrólidos e lincosamidas, dado que dos estudos realizados no nosso território todos apontam para o dobro de estirpes resistentes a estes antibióticos, em relação aos países citados. Deverão ainda ser sensibilizados os obstetras para a utilização apenas de penicilina na prevenção intraparto de infecção neonatal precoce por SGB.

As bactérias resistentes aos macrólidos apresentam três mecanismos de resistência distintos: inactivação enzimática da eritromicina; modificação do sítio alvo; efluxo activo da droga (Leclercq, *et al*, 1991; Wu, *et al*, 1997; Fitoussi, *et al*, 2001).

Nos SGB, a resistência à eritromicina está principalmente associada a dois mecanismos: modificação do sítio alvo e efluxo activo da droga. A presença dos genes associados a

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

estes dois mecanismos foi pesquisada por PCR, nas estirpes que apresentaram resistência à eritromicina e clindamicina. Os resultados obtidos (ver Tabela 12) mostram que os genótipos de algumas das estirpes (códigos 21, 36, 47, 49 e 66) correspondem aos respectivos fenótipos de resistência. Contudo, em algumas estirpes, não foi encontrada essa correlação. Por exemplo, nas estirpes 46 e 48 (Ver tabela 12) que apresentaram um fenótipo de resistência intermédia à eritromicina com susceptibilidade à clindamicina, deveria ser detectado o gene *mef* (A), o que não se verificou.

Esta falta de concordância deverá ser confirmada, uma vez que a determinação do fenótipo de resistência foi avaliada apenas por difusão em disco, sendo importante a determinação de concentrações mínimas inibitórias (MIC) para eritromicina e clindamicina, neste último caso na presença e ausência de eritromicina para avaliar se existe resistência à clindamicina induzida pela eritromicina. Outra possível razão será a presença de uma variante alélica do gene *mef* diferente da pesquisada. A falha na detecção do gene *mef* (A) é, à partida, colocada de parte, visto que os resultados foram confirmados em vários ensaios. Adicionalmente, pode ainda existir um outro mecanismo, mais raramente encontrado, que consiste em mutações no 23S rRNA e nas proteínas ribossomais L4 e L22 (Davies *et al*, 2005), estas mutações foram descritas em *Streptococcus pneumoniae* (Wierzbowski *et al*, 2007) e *Streptococcus pyogenes* (Malbruny *et al*, 2002) não tendo ainda sido descritas em SGB.

Outro caso de discordância entre o fenótipo e o genótipo de resistência foi o da estirpe 54 (ver Tabela 12), que apresenta um fenótipo M de resistência à eritromicina e susceptibilidade à clindamicina, sendo expectável a detecção do gene *mef* (A). Contudo, tal não se verificou e o gene que foi detectado foi o *erm* (A), geralmente associado ao

fenótipo de resistência iMLSB. Tal como referido anteriormente, neste caso também seria importante determinar o MIC para a eritromicina e clindamicina. No caso do fenótipo estar correctamente determinado, poderá o gene *erm* (A) não ser expresso e/ou existir uma variante alélica do gene *mef* (A) não pesquisada.

Em relação à possibilidade da presença de variantes alélicas do gene *mef* não pesquisadas é de referir que outros estudos indicam que na maioria dos casos a variante alélica presente é a (A) apesar de existirem outras descritas, como a variante (E) (Cai *et al*, 2007). É de salientar que noutras populações estudadas em Portugal apenas se encontrou a variante alélica (A) do gene *mef* (Figueira-Coelho *et al*, 2004).

Outro facto que deve ser realçado é que em todas as estirpes resistentes aos macrólidos apenas se detectou um determinante de resistência. O mesmo foi descrito por outros autores em estudos de estirpes isoladas em Portugal (Figueira-Coelho *et al*, 2004).

Concluindo, a prevalência elevada de colonização por SGB entre as grávidas estudadas e a relevante presença de resistências aos antibióticos, enfatizam a importância da prevenção, quer seja pela detecção da bactéria no final da gravidez e na selecção dos antibióticos apropriados, quer pela continuação de estudos que caracterizem a população de SGB em circulação com vista à criação de uma vacina segura e eficaz.

Referências Bibliográficas

1. Adler, A., Block, C., Engelstein, D., Hochner-Celnikier, D., Draï-Hassid R., Moses, A. 2008. *Culture-based methods for detection and identification of Streptococcus agalactiae in pregnant women—what are we missing?. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. V 27, N 3 , 241-243 pp.
2. Amin, A., Y. M. Abdulrazzaq, and S. Uduman. 2002. *Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates. J. Infect.* 45:42-46.
3. Berg, S., Trollfors, B., Lagergard, T., Zackrisson, G., Claesson, B. 2000. *Serotypes and clinical manifestations of group B streptococcal infections in western Sweden. Clin. Microbiol. Infect.* 6:9-13.
4. Berner, R., R. F. Schumacher, S. Bartelt, J. Forster, and M. Brandis. 1998. *Bacteremia in hospitalized children: predisposing conditions and case-related microorganisms. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17:337-340.
5. Boyer, P., Kenneth, M., Samuel, P., 1986. *Prevention of early-onset neonatal group B streptococcal diseases with selective intrapartum chemoprophylaxis. New England Journal of Medicine.* 314: 1665-1669.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M., Yurek, D., Farley, K., Stockman, B., Leclercq, R. 1999. *A New Resistance Gene, linB, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in Enterococcus faecium HM1025. Antimicrob Agents Chemother.* 43(4): 925–929.

7. Cai Y., Kong, F., Gilbert, G. 2007. *Three New Macrolide Efflux (mef) Gene Variants in Streptococcus agalactiae. Journal Clinical Microbiology*, p. 2754–2755.

8. Cascone, C., Santagati, M., Noviello, S., Iannelli, F., Esposito, S., Pozzi, G., Stefani, S. 2002. *Macrolide-resistance genes in clinical isolates of Streptococcus pyogenes. Microb. Drug Resist.* 8:129–132.

9. (CDC(ABCs) Report, 2002)
<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/abcs/survreports/gbs02.pdf>

10. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. *Early-onset and late-onset neonatal group B streptococcal disease—United States, 1996-2004. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 54:1205-1208.

11. Centers for Disease Control and Prevention, 1996: *Prevention of perinatal group B streptococcal disease: A public health perspective. MMWR* 45:1-24.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. Chopra, I., Roberts, M. 2001. *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiol Mol Biol Rev.*; 65(2): 232–260.

13. Christie, R., Atkins, NE., Munch-Petersen, E., 1944. *A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. Aust J Exp Biol Med Sci*, 22: 197-200.

14. Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., Aires de Sousa, M., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Sá-Leão, R., Santos-Sanches, I., Song, J., Tassios, P., Villari, P., and Multilaboratory Project Collaborators. 2000. *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsedfield gel electrophoresis: Comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. Microb. Drug Resist.* 6:189–198.

15. Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, AV., Bergeron, J., Retsema, J. 1996. *A Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, mefA, from Streptococcus pyogenes. Mol Microbiol.* 22:867–879.

16. Cresti, S., M. Lattanzi, A., Zanchi, F., Montagnani, S., Pollini, C., Cellesi, Rossolini, G. 2002. *Resistance determinants and clonal diversity in Group A*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- streptococci collected during a period of increasing macrolide resistance. Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1816–1822.
17. Davies, T., Bush, K., Sahm, D., Evangelista, A. 2005. *Predominance of 23S rRNA Mutants among Non-Erm, Non-Mef Macrolide-Resistant Clinical Isolates of Streptococcus pneumoniae Collected in the United States in 1999-2000. Antimicrob Agents Chemother.*; 49(7): 3031–3033.
18. De la Rosa, M., Perez, M., Carazo, C., Pareja, L., Peis, J., Hernandez, F. 1992. *New Granada Medium for detection and identification of group B streptococci. J. Clin. Microbiol.*; 30:1019-1021.
19. Domelier, AS., Van der Mee-Marquet, N., Arnault, L., Mereghetti, L., Lanotte, P., Rosenau, A., Lartigue, MF., Quentin, R. 2008. *Molecular characterization of erythromycin-resistant Streptococcus agalactiae strains. J Antimicrob Chemother.*;62(6):1227-33. Epub 2008 Sep.
20. Edwards, MS., Baker, CJ. 2005. *Group B streptococcal infections in elderly adults. Clin Infect Dis.*;41(6):839-47.
21. Ekelund, K., Konradsen, HB. 2004. *Invasive group B streptococcal disease in infants: a 19-year nationwide study. Serotype distribution, incidence and recurrent infection. Epidemiol Infect.*; 132(6):1083-90.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

22. Facklam, R., 2002. *What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes*. *Clinical Microbiology Reviews* 15(4) p. 613–630.
23. Fernandez, M., Hickman, M., Baker, C. 1998. *Antimicrobial Susceptibilities of Group B Streptococci Isolated between 1992 and 1996 from Patients with Bacteremia or Meningitis*. *Antimicrob Agents Chemother.*; 42(6): 1517–1519.
24. Figueira-Coelho, J., Ramirez, M., Salgado, M., Melo-Cristino, J. 2004. *Streptococcus agalactiae in a Large Portuguese Teaching Hospital: Antimicrobial Susceptibility, Serotype Distribution, and Clonal Analysis of Macrolide-Resistant Isolates*. *Microbial Drug Resistance*. 10(1): 31-36.
25. Fitoussi, F., Loukil, C., Gros, I., Clermont, O., Mariani, P., Bonacorsi, S., Le Thomas, I., Deforche, D., Bingen, E. 2001. *Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Group B Streptococci Isolated in France*. *Antimicrob Agents Chemther*. 45(6): 1889–1891.
26. Forbes, B.A., et al. 1998. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th ed. C.V. Mosby Company, St. Louis, MO.
27. Fortin, MF. 1996. *O Processo de investigação*. Montreal: Décarie Éditeur.
28. Garcia Gil, E., Rodriguez, M., Bartolome, R., Berjano, B., Cabero, L., Andreu, A. 1999. *Evaluation of the Granada Agar plate for detection of vaginal and*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- rectal group B streptococci in pregnant women. J. Clin. Microbiol.*; 37:2648-2651.
29. Garrity, G., Winters, M., Searles, D. 2004. Taxonomic outline of the Prokariots
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2 nd Ed. Release 5.0. Bergey's
Manual Trust, EUA, 401pp.
30. Gherardi, G., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G., Recchia,
S., Orefici, G., Dicuonzo, G., Creti, R. 2007. *Molecular epidemiology and
distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among
group B streptococci in Italy. J Clin Microbiol.* ;45(9):2909-16
31. Gibbs, RS., Schrag, S., Schuchat, A. 2004. *Perinatal Infections Due to Group B
Streptococci. Obstetrics & Gynecology* ;104:1062-1076.
32. Glass, N., Schulkin, J., Chamany, S., Riley, L., Schuchat, A., Schrag, S. 2005.
*Opportunities to reduce overuse of antibiotics for perinatal group B
streptococcal disease prevention and management of preterm premature rupture
of membranes. Infect Dis Obstet Gynecol.* 13(1): 5–10.
33. Graça, LM., 2005. *Medicina Materno-Fetal 2* (2ª Ed), Lidel, Lisboa, 896pp.
34. Gupta, C., Briski, LE., 2004. *Comparison of Two Culture Media and Three
Sampling Techniques for Sensitive and Rapid Screening of Vaginal Colonization*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- by *Group B Streptococcus in Pregnant Women*. *Journal of Clinical Microbiology* . Vol.42 N.9 p.3975-3977.
35. Hakansson, S., Burman, L., Henrichsen, J., Holm, S. 1992. *Novel co-agglutination method for serotyping GBS*. *J Clin Microbiol*; V30: N12; pp3268-9.
36. Harper, I. A. 1971. *The importance of group B streptococci as human pathogens in the British Isles*. *J. Clin. Pathol.* 24:438-441.
37. Harrison, LH., Elliott, JA., Dwyer, DM., Libonati, JP., Ferrieri, P., Billmann, L., Schuchat, A. 1998. *Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation*. *Maryland Emerging Infections Program. J Infect Dis.*;177(4):998-1002.
38. Henry, J., 1996. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (19^a Ed.), Saunders, Filadélfia, 1556pp.
39. Hensler, ME., Miyamoto, S., Nizet, V., 2008. *Group B Streptococcal β -Hemolysin/Cytolysin Directly Impairs Cardiomyocyte Viability and Function*. *PLoS ONE* 3(6): e2446 doi:10.1371/journal.pone.0002446.
40. Holt, D.E., Halket, S., de Louvois, J., Harvey D. 2001. *Neonatal meningitis in England and Wales: 10 years on*. *Arch. Dis. Child.* 84:F85-F89.

41. Jurgens, D., Sterzik, B., Fehrenbach, FJ., 1987. *Unspecific binding of group B streptococcal coccytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. J Exp. Med.* 1;165(3):720-32.
42. Kalliola, S., Vuopio-Varkila, J., Takala, AK., Eskola, J. 1999. *Neonatal group B streptococcal disease in Finland: a ten-year nationwide study. Pediatr Infect Dis Journal*;18(9):806-10.
43. Klugman, K.P., Capper, T., Widdowson, C., Koornhof, H., Moser, W. 1998. *Increased activity of 16-membered lactone ring macrolides against erythromycin resistant Streptococcus pyogenes and Streptococcus pneumoniae: characterization of South African isolates. J. Antimicrob. Chemother.* 42:729–734.
44. Kowalska, B., Niemiec, KT., Drejewicz, H., Polak, K., Kubik, P., Elmidaoui, A., Gierowska-Bogusz, B., Jaczyńska, R. 2003. *Prevalence of group B streptococcal colonization in pregnant women and their newborns based on the results of examination of patients in the Obstetric and Gynecology Department of the National Research Institute of Mother and Child--a pilot study. Ginekol Pol.*; 74(10):1223-7
45. Lancefield, R. C., 1933. *A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med.* 57:571-595.

46. Lancefield, R. C., 1928. *The antigenic complex of Streptococcus haemolyticus. I. Demonstration of a type-specific substance in extracts of Streptococcus haemolyticus. Journal of Experimental Medicine*, 47: 481-491.

47. Leclercq, R., Courvalin, P. 1991. *Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob Agents Chemther.* 35: 1267-1272.

48. Lin, F., Whiting, A., Adderson, E., Takahashi, S., Dunn, DM., Weiss, R., Azimi, PH., Philips, J., Weisman, L., Regan, J., Clark, P., Rhoads, G., Frasch, C., Troendle, J., Moyer, P., Bohnsack, J. 2006. *Phylogenetic Lineages of Invasive and Colonizing Strains of Serotype III Group B Streptococci from Neonates: a Multicenter Prospective Stud. Journal of Clinical Microbiolog.* Vol. 44, No. 4, pp1257–1261.

49. Lopardo, HA., Vidal, P., Jeric, P., Centron, D., Paganini, H., Facklam, RR., Elliott, J., Argentinian Streptococcus Study Group. 2003. *Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina. J. Clin. Microbiol.*;41(10):4688-94.

50. Luan, S., Granlund, M., Sellin, M., Lagergård, T., Spratt, B., Norgren, M. 2005. *Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. J. Clin. Microbiol.* 43:3727-3733.
51. Maiden, MC. 1998. *Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria.* Clin Infect Dis. Aug;27 Suppl 1:S12-20.
52. Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, CD., Massignani, V., Mora, M. *et al.* 2005. *Identification of a Universal Group B Streptococcus Vaccine by Multiple Genome Screen. Science.* Vol. 309. N. 5731, pp. 148 – 150.
53. Malbruny, B., Nagai, K., Coquemont, M., Bozdogan, B., Andrasevic, A., Hupkova, H., Leclercq, R., Appelbaum, P. 2002. *Resistance to macrolides in clinical isolates of Streptococcus pyogenes due to ribosomal mutations. J Antimicrob Chemother.*;49(6):935-9.
54. Marchese, A., Ramirez, M., Schito, G., Tomasz, A. 1998. *Molecular epidemiology of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae isolates recovered in Italy from 1993 to 1996. J. Clin. Microbiol.* 36:2944–2949.
55. Martínez, MA., Ovalle, A., Durán, C., Reid, I., Urriola, G., Garay, B., Cifuentes, M. 2004. *Serotypes and antimicrobial susceptibility of Streptococcus agalactiae. Rev Med Chil.*;132(5):549-55.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

56. Martins, E., Pessanha, M., Ramirez, M., J. Melo-Cristino, J. 2007. *Analysis of Group B Streptococcal Isolates from Infants and Pregnant Women in Portugal Revealing Two Lineages with Enhanced Invasiveness. J Clin Microbiol.* 45(10): 3224–3229.
57. Moyo, S., Maeland, J., Bergh, K. 2002. *Typing of human isolates of Streptococcus agalactiae (group B streptococcus, GBS) strains from Zimbabwe. Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 51, pp 595–600.
58. Moyo, SR., Mudzori, J., Tswana SA., Maeland, JA. 2000. *Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae) colonization in pregnancy. Cent Afr J Med.*;46(5):115-20.
59. Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. 2005. *Medical Microbiology.* (5° Ed.), Elsevier Mosby, USA, pp. 963.
60. NCCLS. 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement M100-S12. NCCLS, Wayne, Pa.
61. Persson, E., Berg, S., Trollfors, B., Larsson, P., Ek, E., Backhaus, E., Claesson, BE., Jonsson, L., Rådberg, G., Ripa, T., Johansson, S. 2004. *Serotypes and clinical manifestations of invasive group B streptococcal infections in western Sweden 1998-2001. Clin Microbiol Infect.*;10(9):791-6.

62. Pires, R., Rolo, D., Gama-Norton, L., Morais, A., Lito, L., Salgado, M., Johansson, C., Möllerberg, G., Henriques-Normark, B., Gonçalo-Marques, J., Santos-Sanches, I. 2005. *Group A Streptococci from carriage and disease in Portugal: evolution of antimicrobial resistance and T antigenic types during 2000-2002. Microbial Drug Resistance.* December 1, 2005, 11(4): 360-370.

63. Prescott, L., Marley, J., Klein, D., 1999. *Microbiology* (4th Ed.), McGraw-Hill, USA, 516pp.

64. Pritchard, DG., Gray, BM., Dillon, HC., 1984. *Characterization of the group-specific polysaccharide of group B Streptococcus. Arch Biochem Biophys.* Vol. 235, I 2, pp 385-92.

65. Rato, M., Bexiga, R., Nunes, S., Cavaco, L., Vilela, C., Santos-Sanches, I. 2008. *Molecular Epidemiology and Population Structure of Bovine Streptococcus uberis. J. Dairy Sci.* 91: 4542-4551

66. Roberts, M., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, LB., Rood, J., Seppala, H. 1999. *Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. Antimicrob Agents Chemother.* 43(12): 2823–2830.

67. Rosa-Fraile, M. Rodriguez-Granger, M. Cueto-Lopez, A. Sampedro, E. Biel Gaye, J.M. Haro and A. Andreu. 1999. *Use of Granada Medium to detect group*

- B streptococcal colonization in pregnant women. J. Clin. Microbiol.*; 37:2674-2677.
68. Rosa-Fraile, M., Sampedro, A., Varela, J., Garcia-Pena, M., Gimenez-Gallego, G. 1999. *Identification of a peptide pigment from mammal albumins responsible for enhanced pigment production by group B streptococci. Clin. Diag. Lab. Imm.*; 6:425-426.
69. Rosato, A., Vicarini, H., Leclercq, R. 1999. *Inducible or constitutive expression of resistance in clinical isolates of streptococci and enterococci cross-resistant to erythromycin and lincomycin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 43, 559-562.
70. Savoia, D., Gottimera, C., Crocilla, C., Zuccaa, M. 2008. *Streptococcus agalactiae in pregnant women: Phenotypic and genotypic characters. Journal of Infection.* V. 56, I. 2, pp 120-125.
71. Schrag, SJ., Gorwitz, R., Fultz-Butts, K., Schuchat, A. 2002. *Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC: MMWR Recommendations and Reports / 6;51(RR-11):1-22.*
72. Schrag, SJ., Zywicki, S., Farley, MM., et al. 2000. *Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl J Med.* 342(1):15–20.

73. Schuchat, A. 1998. *Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin. Microbiol. Rev.* 11:497-513.
74. Schuchat, A. 1999. *Group B streptococcus. The Lancet*, V353 , 19146 , pp51 – 56.
75. Seppälä, H., Skurnik M., Soini, H., Roberts, MC., Huovinen, P. 1998. *A novel erythromycin resistance methylase gene (ermTR) in Streptococcus pyogenes. Antimicrob Agents Chemother.* 42:257–262.
76. Shanson, DC., Speller, DC., 2000. *Microbiology in Clinical Practice.* (3rd Ed.), Butter Worth and Heinemann, UK, 500pp
77. Sinha, A., Lieu, T., Paoletti, L., Weinstein, M., Platt, R. 2005. *The projected health benefits of maternal group B streptococcal vaccination in the era of chemoprophylaxis. Vaccine* 23:3187-3195.
78. Strahl, W., Rouse, H., Fisher, B., 2001. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 516pp.
79. Struelens, MJ. 1996. *Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect.*;2(1):2-11.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

80. Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., Swaminathan, B. 1995. *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin Microbiol.*; 33(9): 2233–2239.
81. Tor-Udom, S., Tor-Udom, P., Hiriote, W. 2006. *The prevalence of streptococcus agalactiae (group B) colonization in pregnant women at Thammasat Hospital. J Med Assoc Thai.*;89(4):411-4
82. Uh, Y., Kim, H., Jang, I., Hwang, G., Yoon, K. 2005. *Correlation of Serotypes and Genotypes of Macrolide-Resistant Streptococcus agalactiae. Yonsei Med Jou.*;46(4):480-483.
83. Weisblum, B. 1995. *Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother.* 39:577–585.
84. Weisner, AM., Johnson, AP., Lamagni, TL., Arnold, E., Warner, M., Heath, PT., Efstratiou, A. 2004. *Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. Clin Infect Dis.*;38(9):1203-8.
85. Wierzbowski, A., Nichol, K., Laing, N., Hisanaga, T., Nikulin, A., Karlowsky, J., Hoban, D., Zhanel, G. 2007. *Macrolide resistance mechanisms among*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998–2004). *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 733-740.
86. Wu, JJ., Lin, KY., Hsueh, PR., Liu, JW., Pan, HI., Sheu SM. 1997, *High incidence of erythromycin-resistant streptococci in Taiwan. Antimicrob Agents Chemther* 41(4): 844-6.

ANEXOS

ANEXO I

Materiais e Soluções utilizadas na técnica de PFGE

Meio de cultura “Todd-Hewitt ” (Oxoid Hampshire, UK), preparado em frascos Shott, de acordo com instruções do fabricante, esterilizado a 120°C durante 20 minutos em autoclave.

PIV: 10mM Tris pH 8.0; 1.0 M NaCl (Chung *et al*, 2000). Para preparar 500ml de PIV: adicionar a 5 ml de 1,0 M Tris pH 8.0, 29.2g de NaCl (Merck, Germany) e com água bidestilada perfazer 500 ml e autoclavar a solução.

TE 1X (Sambrook *et al*, 1989). Para preparar 1000ml de TE: juntar 10ml de 1M Tris pH 7.5 e 2ml, de 0.5M EDTA pH 8.0 e 988ml de água bidestilada e autoclavar a solução.

Solução de Lise (Solução EC) com Lisozima; mutanolisina e RNase

Solução EC (Chung *et al*, 2000). Para preparar 500ml de EC: juntar 3ml, 1M Tris pH8.0; 29,2g NaCl (Merck, Germany); 100ml, 0.5 M EDTA pH 8.0; 1g, Na desoxicolato (Sigma-Aldrich, USA); 2.5g, Na laurilsarcosina (Sigma-Aldrich, USA); 2.5g, Brij 58 0,5% (Sigma-Aldrich, USA) e adicionar água bidestilada de modo a perfazer 500 ml e autoclavar a solução.

Adicionar ao volume de tampão EC a usar: lisozima (Sigma-Aldrich, USA) a 1 mg/ml em TE; mutanolisina (Sigma-Aldrich, USA) 5U/ μ l em TE; RNase (RNase A, tipo I-AS, Sigma-Aldrich, USA) 50 μ g/ml em água bidestilada.

Solução de Desproteinização ESP: Solução ES+ Proteínase K

Solução ES (Chung *et al*, 2000). Para preparar 500ml de ES:

Adicionar 5g de sarcosil (sódio lauroil-sarcosinato, Sigma- Aldrich, USA) a 500 ml de 0.5M EDTA Na₂ pH 9.0. Ajustar o volume com água bidestilada e autoclavar a solução.

A **proteínase K** a 1mg/ml (Roche, Germany) é misturada ao tampão EC. Esta solução é preparada apenas no dia de uso.

Tampão pré-*Sma*I e Tampão pré-*Cfr*9I

Para o equilíbrio dos discos de DNA é utilizado o tampão pré-*Sma*I (Invitrogen, USA) ou pré-*Cfr*9I ao qual é adicionado β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA) na proporção de 6.3 μ l deste composto para 15 ml de tampão.)

Tampão TBE 0,5X

A 100ml de TBE 10X (BioRad, USA) adicionar 2000ml de água bidestilada e autoclavar a solução.

Solução de Brometo de Etídeo

Preparada com 25 µl de uma solução stock a 10mg/ml (BioRad, USA) em 300ml de água desmineralizada autoclavada. A solução deve ser conservada na ausência de luz e a -4°C.

Solução de Azul de Bromofenol

0.25% de azul de bromofenol

40% (w/v) sacarose (Merck, Germany) em água bidestilada.

Endonucleases de Restrição

- *Sma*I- 20000 U/ml. (Invitrogen, USA)
- *Cfr*9II- 20000 U/ml. (MBI Fermentas, Lithuania)

Agaroses

- Agarose SeaPlaque® GTG®, (Cambrex Bio Science, USA).
- Agarose Seakem® LE (Cambrex Bio Science, USA).

Marcador de pesos moleculares

- Lambda Ladder PFG Marker, 50µg/ml (New England BioLabs, MA).

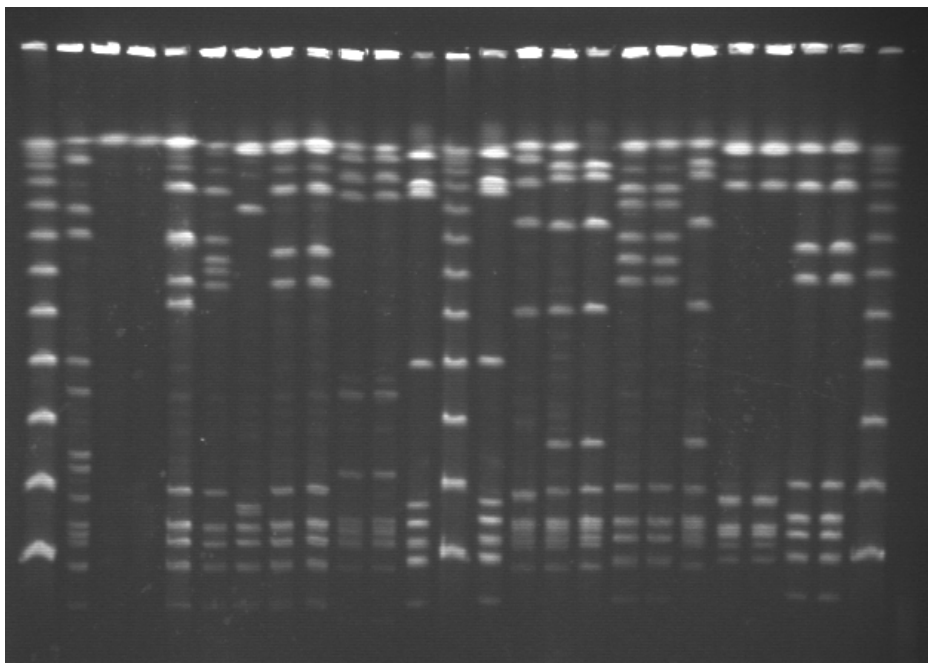
Equipamentos

- Aparelho de PFGE, CHEF-DRIII- Chiller System®. Pulsed Field Electrophoresis Systems, BioRad.
- Sistema Fotográfico-GelDoc (BioRad Software) Quantity One – Version 4.5.0.

- Plataforma de agitação: Standard Rocking Platform WT 15, Biometra.
- Balança de precisão electrónica: Kern[®].
- Estufas: Laboratory Incubators, Heraeus Instruments.
- Banho seco: Unitek, Dry Block Heat Bath, USA/ Scientific Plastics.

ANEXO II

Gel PFGE nº 1



Legenda:

| Lane | Code | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
|------|---------------|--------------------------|
| 1 | Lambda ladder | |
| 2 | 7 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 3 | 14 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 4 | 15 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 5 | 19 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 6 | 21 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 7 | 47 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 8 | 49 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 9 | 54 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 10 | 60 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 11 | 61 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 12 | 64 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 13 | Lambda ladder | |
| 14 | 65 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 15 | 66 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 16 | 69 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 17 | 70 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 18 | 73 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 19 | 74 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 20 | 75 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 21 | 14 | <i>CfrI</i> PFGE Pattern |
| 22 | 15 | <i>CfrI</i> PFGE Pattern |
| 23 | 49 | <i>CfrI</i> PFGE Pattern |
| 24 | 54 | <i>CfrI</i> PFGE Pattern |
| 25 | Lambda ladder | |

Condições:

Run: 1% SeaKem LE in TBE 0,5x

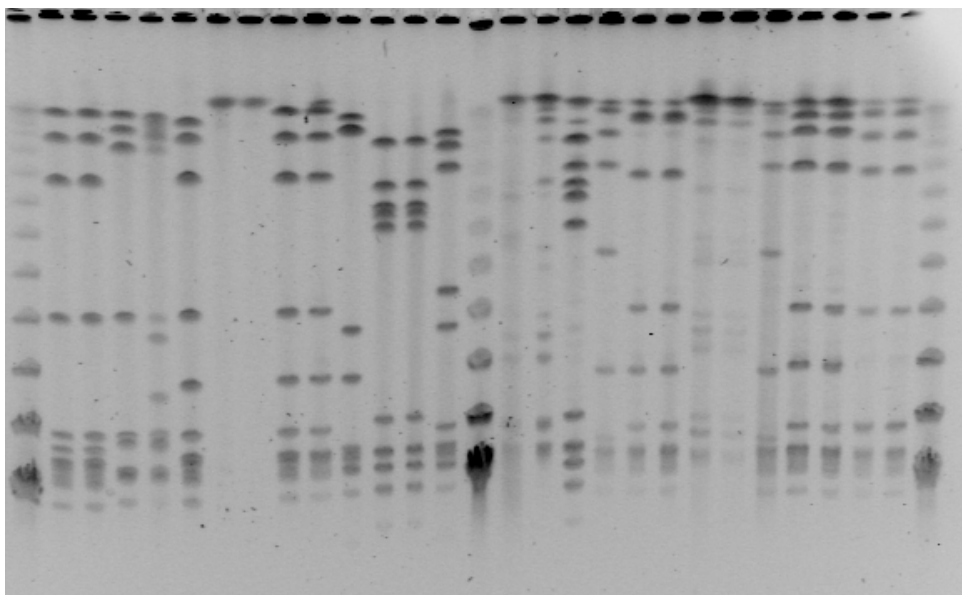
Initial Time: 5 seconds

Final Time: 35 seconds

Voltage: 200V (6V/cm)

Running temperature: 11.3°C

Gel PFGE nº 2



Legenda:

| Lane | Code | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
|------|---------------|--------------------------|
| 1 | Lambda ladder | |
| 2 | 1 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 3 | 2 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 4 | 11 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 5 | 12 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 6 | 13 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 7 | 14 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 8 | 15 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 9 | 16 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 10 | 17 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 11 | 22 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 12 | 23 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 13 | 24 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 14 | 26 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 15 | Lambda ladder | |
| 16 | 34 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 17 | 35 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 18 | 36 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 19 | 44 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 20 | 46 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 21 | 48 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 22 | 50 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 23 | 51 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 24 | 53 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 25 | 55 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 26 | 56 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 27 | 58 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 28 | 59 | <i>SmaI</i> PFGE Pattern |
| 29 | Lambda ladder | |

Condições:

Run: 1% SeaKem LE in TBE 0,5x

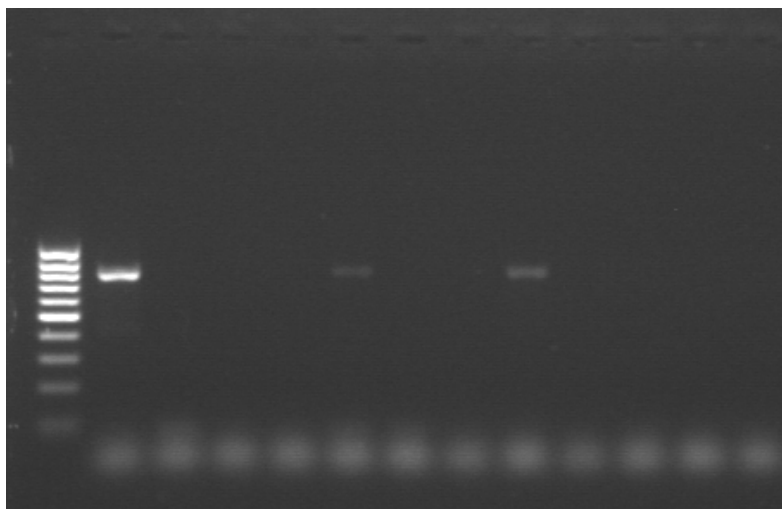
Initial Time: 5 seconds

Final Time: 35 seconds

Voltage: 200V (6V/cm)

Running temperature: 11.3°C

ANEXO III

Gel *erm* (B)

Legenda:

| Lane | Isolate | Species | sample volume (ul) | Result |
|------|------------------|------------------|--------------------|--------|
| 1 | 100bp DNA ladder | | 1 | |
| 2 | 18c22 | Positive control | 10 | + |
| 3 | H2O | Negative control | 10 | - |
| 4 | 14 | GBS | 10 | - |
| 5 | 15 | GBS | 10 | - |
| 6 | 21 | GBS | 10 | + |
| 7 | 36 | GBS | 10 | - |
| 8 | 46 | GBS | 10 | - |
| 9 | 47 | GBS | 10 | + |
| 10 | 48 | GBS | 10 | - |
| 11 | 49 | GBS | 10 | - |
| 12 | 54 | GBS | 10 | - |
| 13 | 66 | GBS | 10 | - |

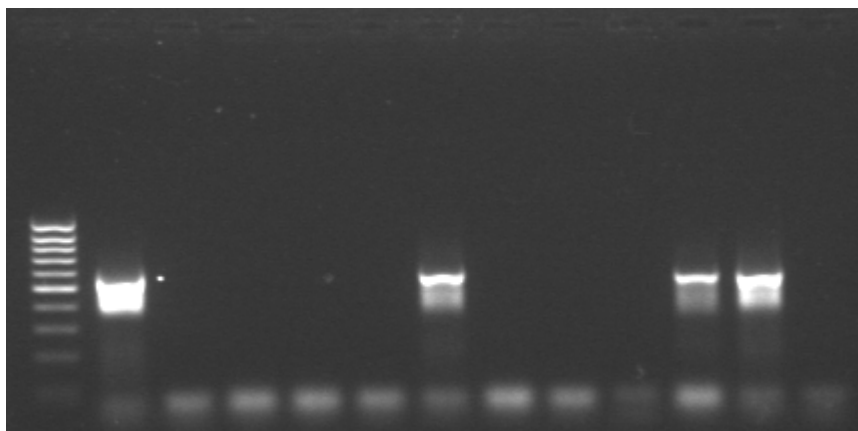
Note: ao volume de DNA a aplicar foi adicionado em todos os poços, 2ul de Azul de bromofenol.

Condições:

Run: 1% Agarose in TAE 1x

Voltage: 100V

Running time: 1h

Gel *erm* (A)

Legenda:

| Lane | Isolate | Species | sample volume (ul) | Result |
|------|------------------|------------------|--------------------|--------|
| 1 | 100bp DNA ladder | | 1 | |
| 2 | 1A77 | Positive control | 10 | + |
| 3 | H2O | Negative control | 10 | - |
| 4 | 14 | GBS | 10 | - |
| 5 | 15 | GBS | 10 | - |
| 6 | 21 | GBS | 10 | - |
| 7 | 36 | GBS | 10 | + |
| 8 | 46 | GBS | 10 | - |
| 9 | 47 | GBS | 10 | - |
| 10 | 48 | GBS | 10 | - |
| 11 | 49 | GBS | 10 | + |
| 12 | 54 | GBS | 10 | + |
| 13 | 66 | GBS | 10 | - |

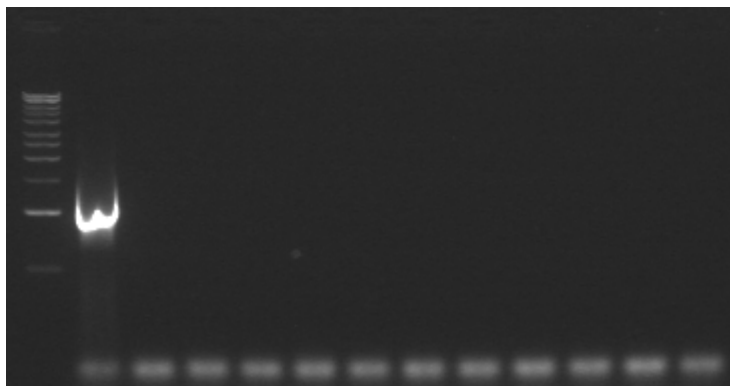
Note: ao volume de DNA a aplicar foi adicionado em todos os poços, 2ul de Azul de bromofenol.

Condições:

Run: 1% Agarose in TAE 1x

Voltage: 100V

Running time: 1h

Gel *mef* (A)

Legenda:

| Lane | Isolate | Species | sample volume (ul) | Result |
|------|-----------------|------------------|--------------------|--------|
| 1 | 1Kbp DNA ladder | | 1 | |
| 2 | 1A77 | Positive control | 10 | + |
| 3 | H2O | Negative control | 10 | - |
| 4 | 14 | GBS | 10 | - |
| 5 | 15 | GBS | 10 | - |
| 6 | 21 | GBS | 10 | - |
| 7 | 36 | GBS | 10 | - |
| 8 | 46 | GBS | 10 | - |
| 9 | 47 | GBS | 10 | - |
| 10 | 48 | GBS | 10 | - |
| 11 | 49 | GBS | 10 | - |
| 12 | 54 | GBS | 10 | - |
| 13 | 66 | GBS | 10 | - |

Note: ao volume de DNA a aplicar foi adicionado em todos os poços, 2ul de Azul de bromofenol.

Condições:

Run: 1% Agarose in TAE 1x
 Voltage: 100V
 Running time: 1h

ANEXO IV

| IsoladoNº | Código do Isolado | Origem | Serotipo | E | DA | OFX | G | VA | T | Fenótipo | Genótipo |
|-----------|-------------------|--------|----------|-----|-----|-----|----|----|----|-----------------------|----------|
| 1 | 312120 | V | Ia | 26 | 23 | 17 | 28 | 17 | 11 | tet | |
| 2 | 312120 | R | Ia | 24 | 22 | 17 | 30 | 18 | 10 | tet | |
| 3 | 311506 | V | III | 27 | 23 | 18 | 27 | 18 | 12 | tet | |
| 4 | 310104 | V | Ia | 26 | 23 | 16 | 28 | 17 | 10 | tet | |
| 5 | 310063 | V | IV | 25 | 24 | 18 | 30 | 18 | 12 | tet | |
| 6 | 309620 | V | II | 25 | 23 | 17 | 31 | 18 | 12 | tet | |
| 7 | 309625 | V | V | 26 | 24 | 17 | 29 | 17 | 14 | tet | |
| 8 | 309591 | V | III | 24 | 22 | 17 | 30 | 17 | 14 | tet | |
| 9 | 309210 | V | III | 25 | 23 | 16 | 30 | 19 | 0 | tet | |
| 10 | 311853 | V | II | 25 | 23 | 16 | 28 | 17 | 12 | tet | |
| 11 | 313154 | R | II | 26 | 24 | 16 | 28 | 18 | 0 | tet | |
| 12 | 313154 | V | II | 25 | 23 | 16 | 29 | 17 | 0 | tet | |
| 13 | 312474 | R | Ia | 25 | 23 | 17 | 30 | 19 | 13 | tet | |
| 14 | 312464 | V | Ib | 25 | 22 | 18 | 30 | 18 | 13 | tet | |
| 15 | 312464 | R | Ib | 25 | 24 | 19 | 31 | 17 | 25 | s | |
| 16 | 312332 | V | Ia | 24 | 23 | 18 | 29 | 18 | 12 | tet | |
| 17 | 312332 | R | Ia | 26 | 22 | 17 | 31 | 19 | 13 | tet | |
| 18 | 311866 | V | Ib | 25 | 23 | 16 | 28 | 17 | 0 | tet | |
| 19 | 313247 | V | IV | 26 | 23 | 17 | 27 | 17 | 26 | s | |
| 20 | 313972 | V | IV | 29 | 25 | 19 | 30 | 19 | 26 | s | |
| 21 | 314344 | V | V | 0 | 0 | 18 | 32 | 17 | 12 | tet/cMLS _B | erm (B) |
| 22 | 314879 | U | III | 32 | 28 | 19 | 32 | 20 | 27 | s | |
| 23 | 314971 | V | V | 30 | 26 | 18 | 32 | 19 | 10 | tet | |
| 24 | 314971 | R | V | 28 | 24 | 17 | 28 | 19 | 10 | tet | |
| 25 | 315899 | V | II | 29 | 25 | 18 | 32 | 20 | 28 | s | |
| 26 | 708567 | H | III | 31 | 28 | 17 | 36 | 23 | 0 | tet | |
| 27 | 315821 | V | Ia | 27 | 24 | 17 | 32 | 18 | 13 | tet | |
| 28 | 316713 | V | III | 27 | 25 | 19 | 32 | 19 | 16 | tet | |
| 29 | 316966 | V | III | 29 | 26 | 20 | 32 | 20 | 14 | tet | |
| 30 | 317013 | V | Ia | 29 | 26 | 21 | 36 | 20 | 27 | s | |
| 31 | 316890 | V | Ib | 31 | 27 | 20 | 30 | 20 | 13 | tet | |
| 32 | 316359 | V | IV | 28 | 25 | 17 | 28 | 19 | 12 | tet | |
| 33 | 317295 | V | III | 30 | 27 | 20 | 40 | 22 | 19 | s | |
| 34 | 317912 | V | Ib | 27 | 24 | 20 | 32 | 20 | 11 | tet | |
| 35 | 317312 | R | Ib | 28 | 26 | 19 | 31 | 20 | 11 | tet | |
| 36 | 318372 | V | IV | 15D | 14D | 18 | 33 | 18 | 10 | tet/iMLS _B | erm (A) |
| 37 | 319325 | V | III | 29 | 26 | 20 | 35 | 18 | 10 | tet | |
| 38 | 319172 | V | III | 31 | 27 | 17 | 35 | 19 | 29 | s | |
| 39 | 524300 | V | Ia | 29 | 26 | 19 | 34 | 20 | 12 | tet | |
| 40 | 320368 | V | V | 27 | 26 | 19 | 30 | 17 | 26 | s | |
| 41 | 320788 | V | III | 28 | 25 | 19 | 31 | 18 | 8 | tet | |

| | | | | | | | | | | | |
|----|--------|---|-----|-----|-----|----|----|----|----|-----------------------|----------------|
| 42 | 525076 | V | II | 31 | 30 | 17 | 36 | 24 | 12 | tet | |
| 43 | 321440 | V | III | 27 | 25 | 19 | 30 | 17 | 12 | tet | |
| 44 | 322227 | R | Ia | 28 | 25 | 18 | 33 | 19 | 12 | tet | |
| 45 | 326131 | V | Ia | 27 | 25 | 17 | 32 | 18 | 12 | tet | |
| 46 | 324341 | R | Ia | 17 | 25 | 18 | 32 | 18 | 10 | tet | |
| 47 | 324290 | V | V | 14 | 0 | 18 | 31 | 18 | 14 | tet/cMLS _B | <i>erm</i> (B) |
| 48 | 324341 | V | Ia | 17 | 25 | 17 | 29 | 18 | 9 | tet | |
| 49 | 323372 | V | V | 14D | 14D | 17 | 30 | 18 | 9 | tet/iMLS _B | <i>erm</i> (A) |
| 50 | 322705 | V | Ib | 28 | 25 | 19 | 30 | 18 | 12 | tet | |
| 51 | 322705 | R | Ib | 27 | 24 | 18 | 34 | 17 | 12 | tet | |
| 52 | 322216 | V | IV | 27 | 24 | 19 | 33 | 18 | 11 | tet | |
| 53 | 322227 | V | Ia | 27 | 25 | 19 | 35 | 19 | 12 | tet | |
| 54 | 326667 | V | V | 14 | 22 | 18 | 30 | 17 | 9 | tet/M | |
| 55 | 328589 | R | IV | 25 | 24 | 18 | 31 | 18 | 13 | tet | |
| 56 | 328589 | V | IV | 26 | 24 | 18 | 32 | 19 | 13 | tet | |
| 57 | 329247 | V | Ia | 26 | 26 | 18 | 34 | 18 | 11 | tet | |
| 58 | 329488 | R | Ia | 27 | 26 | 19 | 34 | 19 | 12 | tet | |
| 59 | 329488 | V | Ia | 26 | 24 | 18 | 31 | 18 | 12 | tet | |
| 60 | 329528 | V | III | 26 | 23 | 18 | 29 | 18 | 0 | tet | |
| 61 | 329528 | R | III | 25 | 23 | 18 | 31 | 17 | 10 | tet | |
| 62 | 329889 | V | Ia | 26 | 24 | 17 | 32 | 18 | 12 | tet | |
| 63 | 329868 | V | V | 25 | 24 | 17 | 32 | 18 | 27 | s | |
| 64 | 330275 | V | IV | 30 | 27 | 19 | 35 | 30 | 27 | s | |
| 65 | 330275 | R | IV | 29 | 26 | 18 | 35 | 20 | 29 | s | |
| 66 | 330431 | V | IV | 25 | 12 | 19 | 30 | 19 | 13 | tet/Lin | |
| 67 | 331552 | V | II | 21 | 26 | 19 | 32 | 18 | 13 | tet | |
| 68 | 331405 | V | Ia | 27 | 24 | 24 | 34 | 18 | 13 | tet | |
| 69 | 332806 | R | Ia | 26 | 24 | 18 | 34 | 18 | 14 | tet | |
| 70 | 332806 | V | Ia | 24 | 22 | 16 | 32 | 17 | 13 | tet | |
| 71 | 334303 | V | 0 | 26 | 23 | 17 | 29 | 17 | 9 | tet | |
| 72 | 335629 | V | V | 25 | 22 | 18 | 29 | 18 | 25 | s | |
| 73 | 336152 | V | V | 27 | 24 | 18 | 32 | 18 | 10 | tet | |
| 74 | 336152 | R | V | 26 | 24 | 19 | 30 | 18 | 10 | tet | |
| 75 | 735914 | H | Ia | 27 | 24 | 18 | 30 | 18 | 14 | tet | |

Legenda: V – exsudado vaginal

R – exsudado rectal

tet – resistência à tetraciclina

tet/cMLS_B – resistência à tetraciclina e resistência constitutiva a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas

tet/iMLS_B – resistência à tetraciclina e resistência induzida a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas

tet/Lin resistência à tetraciclina e lincosamidas

s – susceptível a todos os antibióticos estudados